



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

# **Infección de células oligodendrocíticas con el virus *Herpes simplex* tipo 1. Efectos sobre el proteolípido MAL2**

TESIS DOCTORAL

**Raquel Bello-Morales Arroyo**

Madrid, 2009





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**Memoria presentada por Raquel Bello-Morales para optar al  
grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma  
de Madrid**

Director de Tesis:

Dr. José Antonio López Guerrero

UAM, Departamento de Biología Molecular





## ÍNDICE

---

	Pág.
<b>SUMMARY</b>	iii
<b>ABREVIATURAS</b>	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1-28
<b>1.1. BIOLOGIA DE LOS OLIGODENDROCITOS</b>	3
1.1.1. Células gliales del sistema nervioso central	3
1.1.2. Oligodendrocitos	2
1.1.3. Estructura y composición de la mielina	5
1.1.4. Desarrollo de oligodendrocitos	7
<b>1.2. VIRUS Y DESMIELINIZACION</b>	12
1.2.1. Enfermedades desmielinizantes	12
1.2.2. Esclerosis múltiple	13
1.2.3. Implicación viral en EM	15
1.2.4. El virus <i>Herpes Simplex</i> tipo 1	16
<b>1.3. LA FAMILIA MAL DE PROTEOLÍPIDOS</b>	23
1.3.1. Balsas lipídicas ( <i>lipid rafts</i> )	23
1.3.2. La familia MAL	24
1.3.3. La proteína MAL2	25
1.3.4. Endosomas de reciclaje	27
1.3.5. Polarización de OLs	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	31
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	33-44
<b>3.1. MATERIALES</b>	35

3.1.1. Anticuerpos y reactivos	35
3.1.2. Líneas celulares	36
3.1.3. Cepas víricas	36
<b>3.2. MÉTODOS</b>	37
3.2.1. Obtención y conservación del stock vírico	37
3.2.2. Transfección transitoria	37
3.2.3. Transfección estable	38
3.2.4. Aislamiento de <i>rafts</i> con detergentes	38
3.2.5. Análisis mediante inmunotransferencia	38
3.2.6. Inmunofluorescencia	39
3.2.7. Citometría de flujo	40
3.2.8. Ensayos de transcitosis	40
3.2.9. Infección de las líneas oligodendrocíticas	41
3.2.10. Titulación de virus	41
3.2.11. Valoración de la síntesis de proteínas con <sup>35</sup> S-metionina	42
3.2.12. Microscopía electrónica	43
<b>4. RESULTADOS</b>	45-89
<b>4.1. Crecimiento y diferenciación de las líneas celulares</b>	47
<b>4.2. Estudio de MAL2 en células Oli-neu</b>	49
4.2.1. Expresión de MAL2 y asociación a <i>rafts</i> en células Oli-neu	49
4.2.2. Caracterización del compartimento positivo para MAL2 en células Oli-neu	52
<b>4.3. Estudio de MAL2 en células oligodendrocíticas humanas</b>	54
4.3.1. Transfección estable de líneas oligodendrocíticas	55

4.3.2. Caracterización del CPM2 en HOG	57
4.3.3. Ensayos de transcitosis	63
4.3.4. Estudio de la polarización celular	70
4.3.5. Exosomas	72
<b>4.4. Infección de OLs con HSV-1: estudios preliminares con la línea celular KG-1C</b>	74
<b>4.5. Infección de las líneas Oli-neu y HOG</b>	77
4.5.1. Efecto de la infección sobre MAL2	80
4.5.2. Estudio de la entrada viral	84
<b>5. DISCUSIÓN</b>	91-110
<b>5.1. Infección de OLs con HSV-1: estudios preliminares</b>	93
<b>5.2. Caracterización de MAL2 en células oligodendrocíticas</b>	96
5.2.1. Expresión de MAL2 y asociación a <i>rafts</i>	96
5.2.2. Características del CPM2	98
5.2.3. Ensayos de transcitosis	86
5.2.4. Exosomas	101
<b>5.3. Infección de células Oli-neu y HOG con HSV-1</b>	102
5.3.1. Efecto de la diferenciación celular	102
5.3.2. Entrada viral	103
5.3.3. Relación del virus con MAL2 y el CPM2	104
<b>5.4. Sistemas celulares</b>	105
<b>6. CONCLUSIONES</b>	109
<b>7. REFERENCIAS</b>	113
<b>8. ANEXOS</b>	124

## RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Oligodendrocitos mielinizando axones	4
Figura 2. Estructura de la mielina	7
Figura 3. La glía-NG2 en el linaje oligodendrocítico	8
Figura 4. Diferenciación de OLs en función de la presencia o ausencia de PDGF y TH	9
Figura 5. Etapas del desarrollo de los OLs y sus marcadores	10
Figura 6. Subdominios mielínicos	11
Figura 7. Estructura de HSV-1	17
Figura 8. Entrada de HSV-1	18
Figura 9. Modelo de adhesión de HSV en el que intervienen <i>rafts</i> lipídicos	19
Figura 10. Ciclo de HSV-1	21
Figura 11. Estructura de las balsas lipídicas.	23
Figura 12. Estructura esquemática de la proteína MAL2	25
Figura 13. Representación esquemática del ARE	25
Figura 14. Modelo esquemático de la dinámica de MAL2 y CD59 durante el transporte transcitótico de CD59	26
Figura 15. Cambios morfológicos en las células diferenciadas	47
Figura 16. Formación de láminas semejantes a mielina (myelin-like sheets) en células cultivadas en MD	48
Figura 17. Análisis de la expresión de MAL2 durante la diferenciación en células Oli-neu	49
Figura 18. Cinética de la expresión de MAL2 durante la diferenciación de las células Oli-neu	50
Figura 19. Análisis de MAL2 y el marcador de <i>rafts</i> CTxB en células Oli-neu	51
Figura 20. Análisis confocal de MAL2 y CTxB en células Oli-neu	52
Figura 21. Localización subcelular de MAL2 en células Oli-neu	53
Figura 22. Caracterización del compartimento positivo para MAL2 en células Oli-neu diferenciadas	53
Figura 23. Sensibilidad del compartimento positivo para MAL2 a la disgregación de microtúbulos en células Oli-neu	54
Figura 24. Análisis de MAL2 durante la diferenciación en células HOG	55
Figura 25. Transfección de la línea HOG con GFP-MAL2	56
Figura 26. Transfección de la línea HOG con MAL-diHcRed	56
Figura 27. Transfección de la línea HOG con GFP-MAL2 Y MAL-diHcRed	57

Figura 28. Localización subcelular de GFP-MAL2 en las células HOG	58
Figura 29. Expresión de GFP-MAL2 y asociación a <i>rafts</i> en las células HOG	59
Figura 30. Localización del retículo tubular en células GFP-MAL2/HOG	60
Figura 31. Sensibilidad del compartimento positivo para GFP-MAL2 a la desintegración de microtúbulos en células HOG	61
Figura 32. Análisis confocal de CD59 y Rab11a en células GFP-MAL2/HOG	62
Figura 33. Colocalización de GFP-MAL2 con CD59 y Rab11a en células HOG	63
Figura 34. Distribución de GFP-MAL2 y CD59 durante su movimiento transcitótico	64
Figura 35. Distribución subcelular de GFP-MAL2, CD59 y Tf en células GFP-MAL2/HOG	65
Figura 36. Estudio de la distribución de GFP-MAL2 y CD59 mediante inmunomicroscopía electrónica	67
Figura 37. Estudio de la distribución de CD59 y Tf mediante inmunomicroscopía electrónica	68
Figura 38. Efecto del nocodazol durante el movimiento transcitótico de CD59	69
Figura 39. Polarización celular: distribución de CD59 y Tf en células GFP-MAL2/HOG	71
Figura 40. Expresión de MAL y MAL2 exógenos en estructuras semejantes a vainas de mielina	72
Figura 41. Cuerpos multivesiculares	73
Figura 42. Infección de la línea celular KG-1C con HSV-1	74
Figura 43. Efecto de la infección la línea celular KG-1C sobre la inducción de apoptosis	75
Figura 44. Efecto de la infección de la línea celular KG-1C sobre MAL2	76
Figura 45. Efecto de la infección de la línea celular KG-1C sobre las mitocondrias	77
Figura 46. Infección oligodendrocítica con HSV-1	78
Figura 47. Efecto de la diferenciación celular en la infección con HSV-1	79
Figura 48. Efecto de la infección por HSV-1 sobre la detección de GFP-MAL2	80
Figura 49. Efecto de la infección sobre la diferenciación celular	82
Figura 50. Efecto de la infección sobre el CPM2	83
Figura 51. Estudio de la entrada de HSV-1 en células HOG mediante microscopía electrónica	85
Figura 52. Entrada de HSV-1 en células HOG mediante endocitosis	86
Figura 53. Expresión de receptores de HSV-1 en células HOG	88
Figura 54. Esquema representativo de la función sugerida de MAL2 en OLs	101



## SUMMARY

Demyelinating diseases are the pathological processes of the nervous system that cause myelin injury, and multiple sclerosis (MS) can be considered as one of the most prevalent demyelinating pathologies. MS is a neurodegenerative disease characterized by the formation of multifocal plaques of demyelination in the white matter of the brain and spinal cord. The aetiology, risk factors and development of this neurodegenerative disease remain speculative. Many hypothesis points to a viral implication in the cause of this disease, especially herpesvirus, and among them, Epstein-Barr virus (EBV), Human herpesvirus 6 (HHV-6) and *Herpes simplex* type 1 (HSV-1) have been implicated in the aetiology of this pathology. HSV-1 is a neurotropic virus that affects both the central and peripheral nervous systems. This virus can infect epithelial tissues, establishing latency in sensorial ganglia, and it also can infect the central nervous system. Moreover, some studies have suggested a relationship between HSV-1 and MS.

The general idea of this Ph.D. arose from the relationship between demyelinating processes and viral agents. Few works have undertaken *in vitro* studies on infection of oligodendrocytes (OLS) –the myelin-forming cells– with HSV-1 and, many of them, have been performed in murine systems. So, studies of human oligodendrocytes infections with HSV-1 are scarce.

Consequently, this work outlined some objectives. First of all, to study the susceptibility of oligodendrocytic cells to HSV-1 infection –cytopathic effect, viral productivity, metabolic effects and influence of differentiation on infection–. Second, to study the relationship between the virus and cellular traffic machinery, in particular the apical recycling endosome (ARE), –the subapical compartment (SAC) of hepatocytes–, an endosome involved in indirect transport or transcytosis. This aim was considered relevant since myelinating OLs are polarized cells, and ARE/SAC is crucial in cell polarity and traffic of proteins and lipids. Finally, to characterize MAL2 –a raft protein considered as an ARE/SAC marker– in OLs. No other study has characterized MAL2 in nervous cells and, therefore, one of the first steps of this work consisted of the characterization of MAL2 in oligodendrocytes and the description of the MAL2 positive compartment in those cells.

Our results showed that human oligodendrocytic cells were highly susceptible to HSV-1 infection. Moreover, we found that, in these cells, MAL2 was localized in lipid rafts and its expression was up-regulated during development. In addition, the MAL2 positive compartment in these oligodendrocytic cell lines seemed to share some of the main features of the ARE/SAC

described in epithelial cells, suggesting that this MAL2 positive compartment could be analogous to that endosomal compartment.

HSV-1 infection did not alter the MAL2 positive compartment, although it induced an increment in the expression of this proteolipid. Finally, we observed that the infection was delayed after the induction of differentiation, probably due to the decrease of viral entry in differentiated cells. This concurs with the results obtained in relation to nectin-1 –an HSV-1 receptor–, which decreased with the differentiation and suffered redistribution in the cell membrane.



## ABREVIATURAS

---

3-O-S HS: heparán-sulfato 3-O-sulfatado

ARE: *apical recycling endosome*, endosoma de reciclaje apical

BEEs: *basolateral early endosomes*, endosomas basolaterales tempranos

BHE: barrera hematoencefálica

BSA: seroalbúmina bovina

CE: *common endosome*, endosoma común

CF: contraste de fases

CHAPS: 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonato

CNPasa: 2', 3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa

CNTF: *ciliary neurotrophic factor*, factor neurotrófico ciliar

CPM2: compartimento positivo para MAL2

CTxB: *cholera toxin B subunit*, subunidad B de la toxina colérica

dbcAMP: dibutilil AMP cíclico

DIC: *differential interference contrast*, contraste de interferencia diferencial

DIGs: *detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes*, complejos enriquecidos en glicolípidos insolubles en detergentes

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle medium*, medio Eagle modificado por Dulbecco

DRMs: *detergent resistant membranes*, membranas resistentes a detergentes

ECP: efecto citopático

EE: *early endosomes*, endosomas tempranos

EM: esclerosis múltiple

ERC: *endocytic recycling compartment*, compartimento de reciclaje endocítico

FITC: *fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GalC: galactocerebrósido

GFP: *green fluorescent protein*, proteína verde fluorescente

GPI: glicofosfatidil inositol

GSLs: glucoesfingolípidos

HHV-6: *human herpesvirus 6*, herpesvirus humano 6

HSPGs: *heparan-sulphate proteoglycans*, proteoglicanos heparán-sulfato

HSV-1: virus *Herpes simplex* tipo 1

IBMX: isobutil-3,3-metilxantina

IgA: inmunoglobulina A

IGF-1: *insulin-like growth factor 1*

IgG: inmunoglobulina G

KSHV: *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*, herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi

LAT: *latency associated transcripts*, transcritos asociados a latencia

LCR: líquido cefalorraquídeo

m.d.i.: multiplicidad de infección

MAG: *myelin-associated glycoprotein*, glicoproteína asociada a la mielina

MBP: *myelin basic protein*, proteína básica de mielina

MC: medio de crecimiento

MD: medio de diferenciación

MOG: *myelin oligodendrocyte glycoprotein*, glicoproteína mielínica oligodendrocitaria

MVBs: *multivesicular bodies*, cuerpos multivesiculares

NRGs: neuregulinas

NT-3: neurotrofina-3

OLs: oligodendrocitos

OPCs: *oligodendrocyte precursor cells*, células precursoras oligodendrocíticas

PDGF: *platelet-derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGFR $\alpha$ : *platelet-derived growth factor receptor*, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFA: paraformaldehído

pIgR: *polymeric immunoglobulin receptor*, receptor de la inmunoglobulina polimérica

PLP: proteína proteolípida

PVDF: *polyvinylidene fluoride*, fluoruro de polivinilideno

SAC: *subapical compartment*, compartimento subapical

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

SFB: suero fetal bovino

SN: sistema nervioso

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

T3: triiodotironina

TCID<sub>50</sub>: *tissue culture infectious dose 50*, dosis infecciosa 50 en cultivo de tejidos

Tf: transferrina

TGN: *trans-Golgi network*, red *trans*-Golgi

u.f.p.: unidades formadoras de placas

vhs: *virion host shutoff*

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

WGA: *wheat germ agglutinin*, aglutinina de germen de trigo

ZSV: zona subventricular

## INTRODUCCIÓN

---







## 1.1. BIOLOGÍA DE LOS OLIGODENDROCITOS

### 1.1.1. Células gliales del sistema nervioso central

Las células gliales son las células del sistema nervioso (SN) no excitables eléctricamente, es decir, a diferencia de las neuronas, las células gliales no son capaces de producir potenciales de acción en su membrana plasmática. Su existencia, así como el término ‘glía’, fue planteada por primera vez por el fisiólogo alemán Rudolf Virchow en 1846, aunque ya antes, el fisiólogo suizo Gustav Valentin había sugerido la coexistencia en el cerebro de elementos excitables y no excitables (Verkhatsky y Butt, 2007). Las células gliales son mucho más numerosas que las neuronas –forman el 90% de las células del cerebro humano–. Las de origen neural, es decir, ectodérmico, se agrupan bajo el nombre de macroglía o, más correctamente, neuroglía. Los principales tipos celulares de neuroglía en el sistema nervioso central (SNC) son los oligodendrocitos (OLs), los astrocitos y las células endodiales (Aschner et al., 1999). Además, en el SN existe otro tipo de células de origen mesodérmico, es decir, no neural: la microglía.

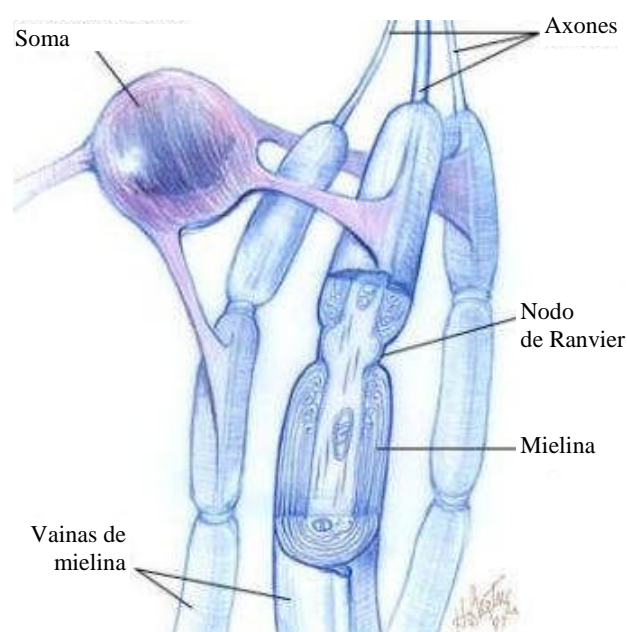
Los histólogos Camillo Golgi, Santiago Ramón y Cajal y Pío del Río Hortega llevarían a cabo los descubrimientos más importantes acerca de las células gliales a finales del siglo XIX y principios del XX. Los astrocitos fueron descritos por Ramón y Cajal en 1913, aunque ya en 1869 Jakob Henle había publicado la primera imagen de redes celulares formadas por células estrelladas –astrocitos–. Años después, Río Hortega describiría los otros dos tipos gliales: la microglía y, en 1928, los OLs. Los astrocitos forman, junto con las células endoteliales, la barrera hematoencefálica (BHE). Entre otras funciones, tienen un papel estructural de sostén, transportan nutrientes hacia las neuronas, mantienen una concentración equilibrada entre el medio extracelular y el intracelular y participan en los procesos de regeneración de lesiones en el SN (Niemann et al., 1999). Las células endodiales forman las paredes de los ventrículos y producen el líquido cefalorraquídeo (LCR). La microglía está formada por pequeñas células fagocíticas originadas a partir de macrófagos que alcanzan el cerebro durante el desarrollo temprano y se asientan en el SNC. Constituyen, por tanto, el sistema inmunitario cerebral. Por un lado, la microglía juega un papel positivo tras una lesión, ayudando a la reparación de las neuronas, pero por otro, puede producir también alteraciones neurológicas, ya que libera productos nocivos para las células, como citoquinas o factor de necrosis tumoral (TNF).

La idea de una interacción activa entre neuronas y glía fue propuesta por primera vez por Carl Ludwig Schleich en 1894, aunque éste pensaba que las células gliales participaban en la

propagación del impulso nervioso. Hoy ya se acepta que los circuitos neuronales y gliales se comunican mucho más estrechamente de lo que podía parecer en un principio, y la glía ha dejado de considerarse un elemento ‘pasivo’ en el SN. A este paradigma han contribuido grupos como los de Kettenmann y Kimelberg que, en 1984, descubrieron receptores de glutamato y GABA en astrocitos y OLs en cultivo (Bowman y Kimelberg, 1984; Kettenmann et al., 1984). De hecho, cada vez hay más evidencias de que los astrocitos participan también en la transmisión de información en el cerebro, ya que influyen en la eficacia de la transmisión nerviosa entre las neuronas (Perea y Araque, 2007).

### 1.1.2. Oligodendrocitos

Los OLs (**Figura 1**) son las células del SNC encargadas de la formación de las vainas de mielina (Simons y Trotter, 2007). La vaina de mielina, que debe su nombre a Virchow, es una estructura espiral formada por extensiones de la membrana plasmática de los OLs en el SNC dispuesta de manera concéntrica alrededor de los axones (Ndubaku y de Bellard, 2008). Los OLs pueden rodear varios axones mientras que las células de Schwann, las células formadoras de mielina en el sistema nervioso periférico (SNP) rodean sólo uno. Ambos tipos celulares se diferencian



**Figura 1. Oligodendrocitos mielinizando axones**

también en que producen mielina de distinta estructura y en que tienen distinta capacidad mitótica y regenerativa, que es más lenta en los primeros. Asimismo, *in vitro* las células de Schwann son totalmente dependientes tanto del contacto como de las señales axonales, es decir, si la comunicación con el axón se bloquea o desaparece, las células de Schwann se desdiferencian. Por el contrario, los OLs no son tan dependientes del contacto neuronal ni se desdiferencian *in vitro* en ausencia de señales neuronales (Dubois-Dalcq et al., 1986). *In vivo*, claro está, existe una relación estrecha entre axones y OLs, dependiendo los unos de los otros para su correcto funcionamiento e integridad: la pérdida de axones provoca degeneración de los OLs y, a la inversa, los axones degeneran en ausencia de OLs. Esto se debe a que, posiblemente, la diferenciación de los OLs *in vitro* esté promovida por factores que normalmente producen los



axones *in vivo* (Greenwood y Butt, 2002). Además de en la sustancia blanca, la oligodendroglía se halla también en la gris, ya que hay un tipo de OLs no mielinizantes, llamados satélites, que rodean los cuerpos celulares de las neuronas. Aunque su función no es del todo conocida, parece que actúan como reguladores del microambiente alrededor de éstas.

La vaina de mielina no es continua a lo largo del axón, sino que está interrumpida por los nodos de Ranvier. Esta discontinuidad permite que la conducción del impulso nervioso se produzca de manera “saltatoria”, aumentando así enormemente la velocidad de conducción, que en axones mielínicos es de 100 m/s como promedio, mientras que en axones amielínicos es sólo de 0.5 m/s. Por otro lado, algunas proteínas de la mielina funcionan como inhibidores del crecimiento y la regeneración axonal, y a ello se debe, al menos en parte, que, a diferencia de las neuronas jóvenes, las neuronas ya mielinizadas del SN adulto sean incapaces de regenerarse después de una lesión.

En general, sólo los vertebrados tienen verdadera mielina, aunque algunos grupos de invertebrados, por ejemplo algunos copépodos –crustáceos– y anélidos, también la producen. Para contrarrestar la ausencia de mielina en los invertebrados, algunas especies, como el calamar gigante, utilizan el aumento del diámetro del axón para incrementar la velocidad de propagación del potencial de acción, –ya que los potenciales de acción se propagan más rápido en axones mayores–, aunque no se llega a alcanzar la velocidad de los axones mielinizados de los vertebrados (Zalc, 2006). La conducción saltatoria ha desempeñado un papel importante en la evolución, ya que, sin ella, la velocidad de conducción requeriría incrementos drásticos en el diámetro axonal y, por tanto, se necesitarían sistemas nerviosos muy grandes. Algunas enfermedades afectan a la conducción saltatoria y disminuyen la velocidad de desplazamiento del potencial de acción. La más conocida es la esclerosis múltiple (EM), en la que los daños a la mielina afectan gravemente al funcionamiento correcto del SN (MacLean y Freedman, 2009).

### 1.1.3. Estructura y composición de la mielina

La mielina está compuesta, en peso seco, aproximadamente por un 70% de lípidos y un 30% de proteínas, y tiene un bajo contenido en agua –alrededor de un 40%–. Esta composición tan distinta de la de las membranas celulares del resto de los tejidos, es acorde con su papel aislante dentro de su función de conducción del impulso nervioso (Deber y Reynolds, 1991). Los lípidos que constituyen la mielina son colesterol, fosfolípidos y glucolípidos en una proporción 4:3:2. Una de las principales características de los lípidos de los OLs y la mielina es su riqueza en

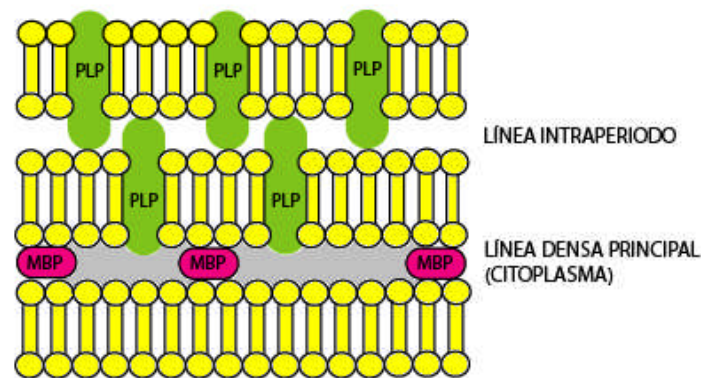
glucoesfingolípidos (GSLs), en particular las galactosilceramidas o galactocerebrósidos (GalC) y sus derivados sulfatados, las sulfogalactosilceramidas o sulfátidos. Esto proporciona a la mielina unas características inusuales en relación al resto de las membranas plasmáticas. Además, la alta proporción de GSLs va acompañada por una baja proporción de fosfatidilcolina, el principal lípido de la membrana plasmática de la mayoría de las células. Los GalC y los sulfátidos son marcadores tempranos de superficie en los OLs maduros *in vitro* e *in vivo*. Los GalC son las primeras moléculas específicas de OLs expresadas por las células precursoras de OLs en estado de diferenciación. Son los lípidos más típicos, representando el 20% del peso seco de los lípidos de la mielina madura, y se consideran marcadores específicos de superficie celular de OLs en cultivo.

Los componentes proteicos más importantes, constituyendo el 80% del total de proteínas de la mielina, son la proteína básica de mielina (MBP) y la proteína proteolipídica (PLP), existiendo otras proteínas minoritarias como la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), la glicoproteína mielínica oligodendrocitaria (MOG) y la proteína  $\alpha$ B-cristalina (Baumann y Pham-Dinh, 2001). Muchas de las proteínas de mielina más importantes del SNC –como PLP y MAG– están aciladas covalentemente, lo que les proporciona propiedades hidrofóbicas. PLP es una proteína transmembrana que constituye casi el 50% de las proteínas de la mielina. Está formada por dos isoformas: la PLP *full-length* y la DM20. La función de la PLP es estabilizar las uniones de la membrana, estabilizando las uniones intraperiodo. En ratones *knock-out* para PLP, que no expresan PLP ni DM20, si bien los OLs son capaces de mielinizar los axones, la vaina de mielina carece de estabilidad (Boison y Stoffel, 1994). MBP es una familia de proteínas citosólicas que se fosforilan y forman dímeros, estabilizando la línea densa principal de la mielina al interactuar con los lípidos cargados negativamente. Hay muchas isoformas de diferente peso molecular originadas por *splicing* alternativo del precursor común. MAG es una glicoproteína integral de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

MOG es una proteína transmembrana específica de los OLs localizada en la superficie exterior de la vaina de mielina (Brunner et al., 1989). Es un componente minoritario de las proteínas mielínicas, representando sólo alrededor del 0.1% del total, pero es un importante autoantígeno en modelos animales. Es un marcador de OLs maduros. La 2', 3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) se encuentra en regiones específicas de los OLs –como en la membrana plasmática y sus extensiones– y en los paranodos de la mielina. Aunque su función biológica no está bien definida, se sabe que juega un papel importante en la formación de la vaina de mielina. La sobreexpresión de CNP en ratones transgénicos produce expansiones

aberrantes de la membrana de los OLs. Por otro lado, se ha demostrado la existencia de epítomos compartidos por la CNPasa de la mielina y ciertos agentes infecciosos –coronavirus 229E, *Mycobacterium leprae*, herpesvirus humano 6 (HHV-6), virus sincitial, etc.–, lo que podría sugerir la relación entre estos agentes y el desencadenamiento de la respuesta inmunológica contra la mielina. La transaldolasa es otra de las proteínas mielínicas del SNC implicadas en la autorreactividad de las células T y parece disminuir en las lesiones desmielinizadas del cerebro en EM (Colombo et al., 1997). Además, se han encontrado anticuerpos contra la transaldolasa en sangre y LCR de pacientes con EM y no en pacientes controles sanos (Banki et al., 1994).

Con respecto a la organización de la mielina, las membranas celulares apiladas forman una estructura sólida donde se pueden distinguir dos tipos de líneas: las líneas intraperiodo, que no contienen citoplasma, y las líneas densas principales, que incluyen el citosol (**Figura 2**).



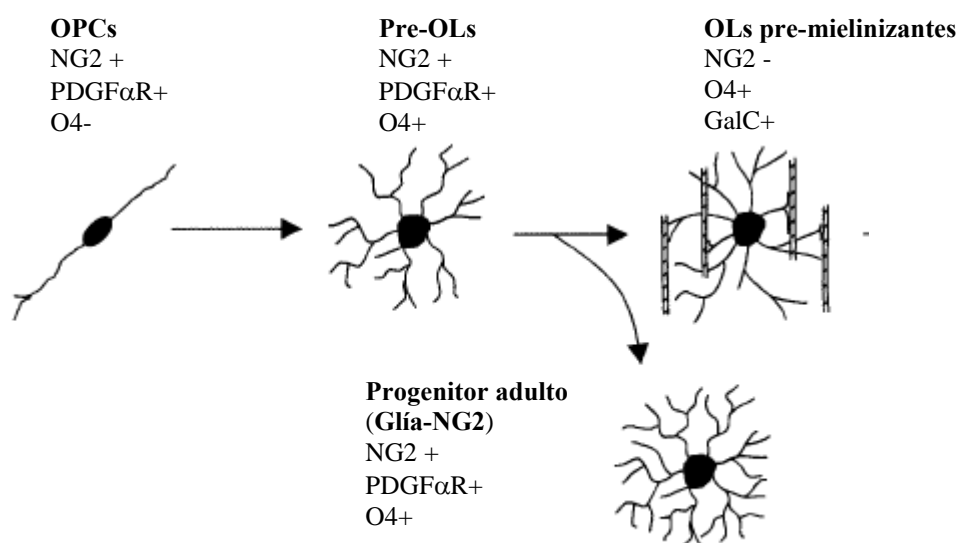
**Figura 2. Estructura de la mielina**

#### 1.1.4. Desarrollo de los oligodendrocitos

El cerebro adulto contiene células madre y progenitoras con capacidad de autorrenovación y con la habilidad de diferenciarse en neuronas funcionales y glía (Gage, 2000). Las células madre neurales adultas se han encontrado principalmente en el hipocampo y en la zona subventricular (ZSV), así como en regiones no neurogénicas como la espina dorsal (Temple, 2001). En el desarrollo embrionario, la ZSV –que se encuentra debajo del ventrículo lateral del telencéfalo– es una fuente de nuevas neuronas y glía (Levison y Goldman, 1993), y contiene precursores gliales que migran a la corteza y la materia blanca para formar astrocitos, OLs y glía-NG2 (Nait-Oumesmar et al., 1999). Además, la progenie de la ZSV migra también al bulbo olfatorio –a lo largo de una ruta llamada corriente migratoria rostral– donde forma neuronas (Doetsch et al., 1997). La ZSV se va atrofiando progresivamente tras el nacimiento.

Los OLs derivan de unas células con capacidad mitótica llamadas OPCs (*oligodendrocyte precursor cells*, células precursoras oligodendrocíticas), que se encuentran también en el SNC adulto. *In vivo*, estas células se dividen durante el desarrollo un número limitado de veces hasta que se detienen y se diferencian en OLs postmitóticos (Temple y Raff, 1986). En la mayoría de los animales esto ocurre relativamente tarde en el desarrollo del SNC, durante las últimas etapas del estado embrionario y la vida postnatal temprana, tras la formación de neuronas y astrocitos. Las OPCs se desarrollan en la ZSV del cerebro y la espina dorsal mediante un proceso que depende de los factores de transcripción Olig1, Olig2, SOX10 y Nkx2.2, y de las moléculas señalizadoras *sonic hedgehog* (Shh), proteína morfogenética ósea y Notch. Las OPCs migran a sus destinos finales en el cerebro y la espina dorsal y allí, en función de las señales externas, proliferan y se diferencian o mueren por apoptosis. Los OPCs se caracterizan por la expresión de PDGF $\alpha$ R (*platelet-derived growth factor receptor*, receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas), NG2, un proteoglicano condroitín sulfato, y el gangliósido GD3. En cultivo, los precursores de OPCs pueden diferenciarse bien a astrocitos tipo 2, o bien a OLs, en función del medio de cultivo, y por eso se han llamado también células progenitoras O-2A (Raff et al., 1983) aunque no está claro si este comportamiento se produce también *in vivo* (Fulton et al., 1992). Son varios los factores de crecimiento que inducen la proliferación de los OPCs en cultivo, entre ellos PDGF, CNTF (*ciliary neurotrophic factor*, factor neurotrófico ciliar), neurotrofina-3 y neuregulinas.

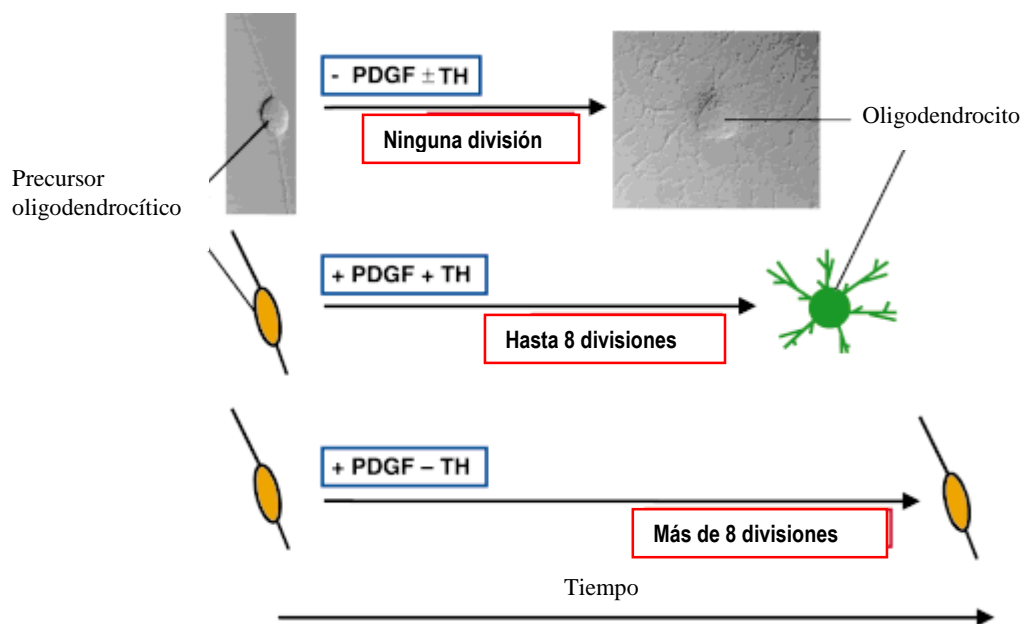
Durante el desarrollo de los OLs, los OPCs –que expresan NG2– generan, además de OLs mielinizantes, una importante población de células gliales que persiste en las sustancias blanca y gris del SNC adulto: la llamada glía-NG2 (Berry et al., 2002; Butt et al., 2005) (**Figura 3**).



**Figura 3.** La glía-NG2 en el linaje oligodendrocítico. Adaptado de (Dawson et al., 2000)

Hasta hace pocos años se consideraba que toda la glía que expresaba NG2 pertenecía a un mismo tipo celular: las OPCs. No obstante, ahora la llamada glía-NG2 se incluye en un tipo celular diferente en base a sus diferencias morfológicas, fisiológicas y de linaje (Greenwood y Butt, 2003). Por eso, estas células se han llamado también sinantocitos (Butt et al., 2002) o polidendrocitos (Nishiyama et al., 2009), para diferenciarlas de los OPCs, que también expresan NG2. La glía-NG2 expresa además marcadores de progenitores oligodendrocíticos como PDGF $\alpha$ R, pero no de OLs maduros –no expresan proteínas de mielina ni GalC– ni de astrocitos –tampoco expresan GFAP, vimentina, S100 $\beta$  o glutamín-sintetasa–. Esta glía responde con enorme rapidez a los daños al SNC y es capaz de generar OLs tras una lesión desmielinizante, mediante el crecimiento y la proliferación de prolongaciones citoplásmicas llamadas procesos. Además, también puede generar astrocitos y, posiblemente, neuronas, manteniendo su capacidad pluripotencial durante la vida adulta. En la sustancia gris, la glía-NG2 forma contactos con neuronas, y en la sustancia blanca, extienden numerosos procesos a lo largo de los axones mielinizados y establecen contactos con los núcleos de Ranvier.

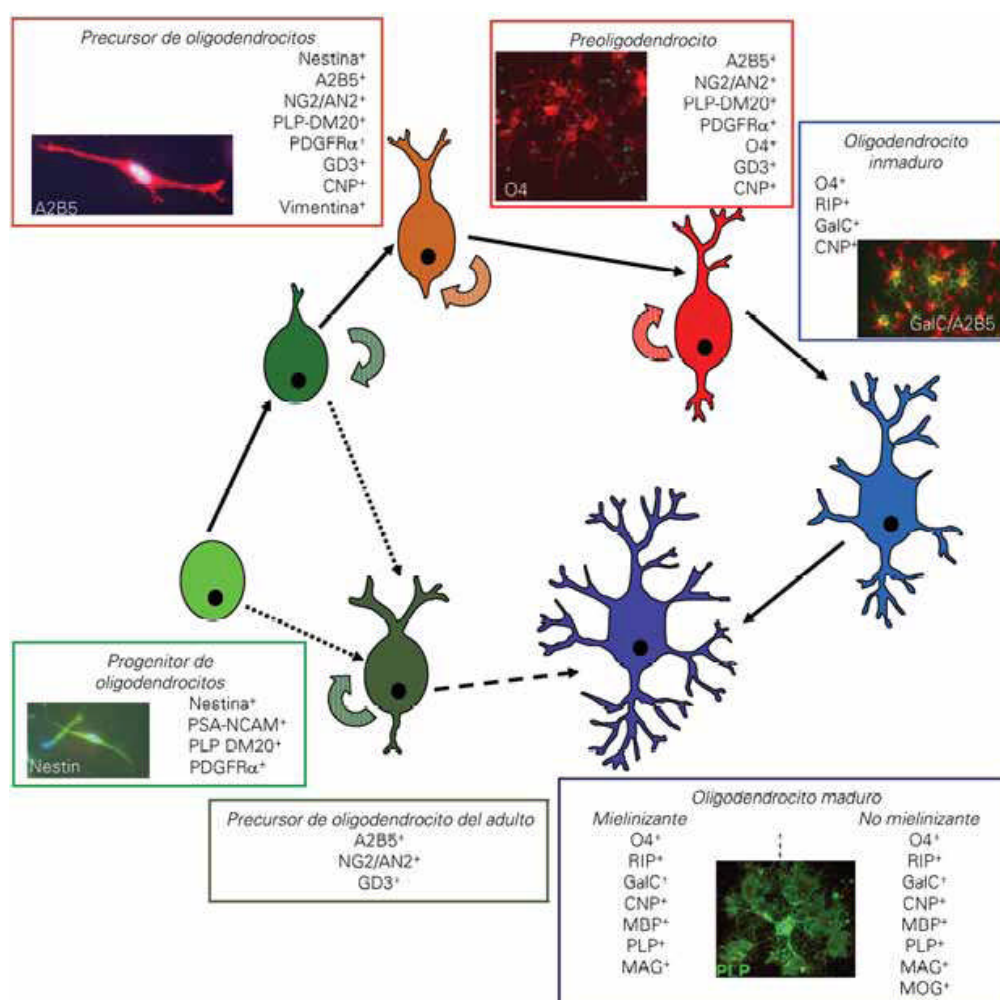
Los OPCs se diferencian en OLs maduros en respuesta a numerosos factores. El balance entre la proliferación y la diferenciación depende de hormonas y factores de crecimiento sintetizados en el SNC y ciertos neurotransmisores: glutamato y GABA, por ejemplo, regulan la diferenciación de las OPCs *in vitro*.



**Figura 4. Diferenciación de OLs en función de la presencia o ausencia de PDGF y TH (hormona tiroidea T3).** Adaptada de (Durand y Raff, 2000)

La hormona tiroidea T3 –triiodotironina–, IGF-1 y transferrina (Tf) son importantes activadores de la diferenciación, aunque este proceso depende del conjunto de factores extracelulares en los que se encuentran inmersas las células (**Figura 4**).

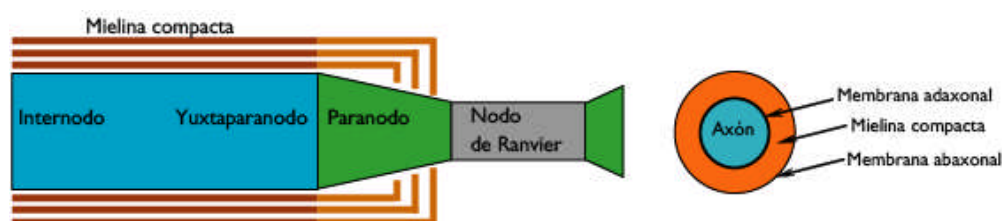
Durante su desarrollo, los OLs maduran a través de una serie de etapas, cada una de las cuales se caracteriza por una serie de marcadores de diferenciación: células precursoras, progenitores O-2A, pre-OLs, OLs inmaduros, OLs maduros no mielinizantes y OLs maduros mielinizantes (Gielen et al., 2006). El desarrollo de OLs se caracteriza por los cambios continuos en la expresión de los marcadores de diferenciación (**Figura 5**).



**Figura 5. Etapas del desarrollo de los OLs y sus marcadores.** Tomada de (Bribian y de Castro, 2007)

La diferenciación de OLs tiene muchos aspectos en común con la de las células epiteliales (Trapp et al., 1997). Durante dicho proceso, los OLs adquieren un fenotipo polarizado: la vaina

de mielina equivaldría al dominio apical –dado su alto contenido en GSLs y colesterol– y la membrana plasmática del OL equivaldría al dominio basolateral (de Vries y Hoekstra, 2000; de Vries et al., 1998). Por tanto, aunque los OLs mielinizantes no forman los clásicos dominios apical y basolateral de las células epiteliales polarizadas, separados por uniones estrechas –*tight junctions*–, se pueden considerar células polarizadas, semejantes a las epiteliales y neuronales. Además de los dos dominios principales presentes en los OLs, la mielina tiene distintos subdominios: mielina compacta, paranodos, membrana periaxonal o adaxonal y membrana abaxonal (Figura 6).



**Figura 6. Subdominios mielínicos**

Para generar este complejo sistema de membranas, es necesario que grandes cantidades de proteínas y lípidos se sintetizen, se clasifiquen y se transporten a las zonas apropiadas. Además es necesario mantener un equilibrio permanente entre la síntesis y la renovación de la mielina para evitar la desmielinización (Niemann et al., 1999). Las maquinarias de transporte y clasificación –*sorting*– hacia los dominios apical y basolateral están extensamente descritos en células epiteliales polarizadas y neuronas. La ruta de transporte directo parece estar mediada por la integración de la carga –después de pasar por el aparato de Golgi– en DIGs (*detergent-insoluble glycolipid-enriched complexes*, complejos enriquecidos en glicolípidos insolubles en detergentes) o balsas lipídicas –*lipid rafts*– que dan lugar a vesículas destinadas a la superficie apical. Por el contrario, las proteínas transportadas mediante la ruta indirecta, se dirigen primero a la cara basolateral, para, después, ser endocitadas y transportadas a la superficie apical mediante el proceso denominado transcitosis.

Varios estudios han sugerido que los OLs mielinizantes pueden usar un mecanismo de clasificación semejante al de las células epiteliales polarizadas (Kroepfl y Gardinier, 2001; Simons et al., 2000). También se ha sugerido que la transcitosis puede constituir un mecanismo de tráfico de componentes de mielina en OLs (Kramer et al., 2001).

## 1.2. VIRUS Y DESMIELINIZACIÓN

### 1.2.1. Enfermedades desmielinizantes

El SNC no tiene protección contra las infecciones a excepción de la microglía. Esto se debe a que, en condiciones normales, los sistemas inmunitario y nervioso se evitan el uno al otro, porque la BHE impide el contacto. Por ello, los procesos inflamatorios sólo se producen en los espacios del líquido cefalorraquídeo (LCR), es decir, meninges y ventrículos cerebrales, no en el parénquima cerebral. No obstante, en condiciones patológicas puede producirse infiltración de células inmunitarias al SN. Esto se produce si las células inmunitarias cruzan la BHE y producen una respuesta inmune local, segregando proteasas que disgregan la BHE y facilitando la migración de más células al parénquima cerebral. En condiciones normales, los daños al SN disparan reacciones específicas de las células gliales, que se conocen como gliosis reactivas: reacciones de la astroglia –astroglisis reactiva–, la microglía –activación de la microglía– y los OLs y las células de Schwann –degeneración Walleriana y desmielinización–.

En las enfermedades desmielinizantes se produce inflamación del parénquima del SNC, produciéndose la activación de la microglía y la producción de anticuerpos contra proteínas de la mielina. En el SNC, las enfermedades desmielinizantes producen la destrucción de las vainas de mielina y/o los OLs. Tras un episodio de desmielinización, el primer paso en el proceso de remielinización consiste en el reclutamiento de OPCs hacia la zona de la lesión y su proliferación. Después se produce la fase de diferenciación de las OPCs, es decir, la formación de prolongaciones celulares y el enrollamiento de éstas alrededor de los axones para restablecer la mielina compacta. Aunque en las enfermedades desmielinizantes se puede producir cierta remielinización espontánea, no se alcanza la reparación completa del daño, a diferencia de lo que ocurre, por ejemplo, en modelos experimentales de remielinización en ratas, en los que se han conseguido remielinizaciones totales. No se sabe exactamente por qué falla la remielinización en enfermedades desmielinizantes humanas, pero las lesiones se vuelven crónicas y se caracterizan por la presencia de astrocitos cicatrizantes. Parece ser que si durante el proceso reparador no se da el ambiente fisiológico adecuado, se produce un fallo en los eventos señalizadores que dirigen el proceso, eventos que están muy relacionados además con la respuesta inflamatoria (Franklin, 2002).

Los precursores oligodendrocíticos pueden diferenciarse y proporcionar remielinización funcional de axones después de procesos de desmielinización focal experimentales, pero para la



aplicación de este fenómeno a enfermedades como la EM, por ejemplo, el principal problema es cómo estimular la migración de esas células a los diversos sitios de desmielinización. En cualquier caso, muchas observaciones apoyan la idea de que el SNC en mamíferos adultos tiene la capacidad de generar células gliales a lo largo de toda la vida, principalmente OLs. De hecho, se ha constatado la presencia *in situ* de progenitores oligodendrocíticos en SNC de adultos sanos así como en lesiones de EM (Scolding et al., 1998). Comprender por qué falla entonces la remielinización sería el primer paso para establecer tratamientos adecuados (Miller y Mi, 2007).

### 1.2.2. Esclerosis múltiple

La EM es una enfermedad desmielinizante, crónica e inflamatoria del SNC en la que linfocitos T atacan a los OLs (Miller, 2005). Tiene dos formas de evolución. La mayoritaria es la recurrente-remitente, en la que se producen brotes esporádicos sin que haya progresión de la enfermedad entre las recidivas. Las formas crónicas progresivas, por el contrario, conllevan un deterioro neurológico paulatino. La EM se caracteriza anatomopatológicamente por la presencia de múltiples lesiones en la sustancia blanca del SNC, cuyo rasgo más importante es la pérdida de mielina que rodea a los axones, con relativa preservación de éstos. Estas lesiones o placas aparecen en brotes, y pueden aparecer en cualquier localización de la sustancia blanca del encéfalo y médula espinal, dando lugar a una sintomatología muy variable según la localización. En realidad, la EM presenta distintos modelos de desmielinización, y podría considerarse como un conjunto de enfermedades diferentes con características clínicas y resultados patológicos similares. La forma recurrente-remitente se caracteriza más por la destrucción de mielina y la presencia de inflamación local, sin estar asociada significativamente a muerte de OLs. Las formas crónicas están asociadas a muerte de OLs, que puede producirse por apoptosis o necrosis. Cuando la muerte de OLs se produce por necrosis, la forma se denomina ‘primaria progresiva’, y conlleva un deterioro neurológico severo. Además, se está empezado a considerar la apoptosis de OLs como un paso clave en el comienzo de la enfermedad.

Desde un punto de vista inmunológico, se producen células T CD4+ específicas de mielina que infiltran el SNC (Hellings et al., 2002; Sospedra y Martin, 2005), y hasta el momento, se ha constatado la entrada en el SNC de linfocitos activados contra las proteínas MBP (Meinl y Hohlfeld, 2002) y PLP (Greer y Pender, 2008). Estas células dirigen la respuesta inmune que termina por destruir la cubierta mielínica de los axones. Por otro lado, se han encontrado títulos elevados de anticuerpos contra ciertos virus, como los del sarampión, la varicela y HSV-1, en el LCR de pacientes de EM (Sarchielli et al., 1993; Skorstad et al., 2009). La presencia de bandas

oligoclonales de inmunoglobulinas en el LCR, cuando el suero sanguíneo es normal, es un factor diagnóstico. Estas bandas oligoclonales aparecen en el 90-95% de las personas afectadas de EM, aunque también pueden encontrarse en otras enfermedades.

No obstante, hay un estudio reciente realizado con pacientes de EM fallecidos al comienzo de un brote de la enfermedad, en los que no se observa infiltración de células T en las áreas dañadas (Barnett y Prineas, 2004), lo que podría suponer la implicación de procesos desconocidos hasta el momento en el origen de la enfermedad (Matute y Perez-Cerda, 2005). Por tanto, hay un nuevo paradigma sobre el origen de la EM en el que la apoptosis de OLs sería el desencadenante inicial de las lesiones, y en el que el daño tisular se amplificaría por la respuesta inmune posterior (Barnett y Sutton, 2006).

Aunque se acepta actualmente que muchas proteínas de mielina, como PLP, MAG y MOG, así como otras no mielínicas, podrían ser autoantígenos relevantes en enfermedades desmielinizantes (Gran y Rostami, 2001), muchos de estos datos se basan en estudios animales o en experimentos *in vitro*. Sin embargo, no es posible demostrar que las células T humanas específicas para antígenos *in vitro* son patógenas *in vivo*. Además, cualquier respuesta inicial de las células T a un autoantígeno puede desencadenar una respuesta de células T diversificada, en contra de otros autoantígenos del SNC, un fenómeno descrito como "diseminación epitópica", que hace que resulte difícil determinar el "autoantígeno primario".

Por tanto, la etiología de la EM y los factores que determinan su curso siguen siendo especulativos (MacLean y Freedman, 2009). Como se acaba de apuntar, muchos estudios sugieren que puede haber una infección viral implicada en la etiología de esta enfermedad (Noseworthy, 1999), siendo los herpesvirus los candidatos más aceptados (Christensen, 2007). En concreto, HHV-6 y el virus de Epstein-Barr (EBV) tienen en la actualidad un gran interés científico en relación con la etiología de la EM (Casetta y Granieri, 2000; Clark, 2004; Goodman et al., 2003; Wagner et al., 2004).

No obstante, hay dos aspectos que no son por el momento explicables: el primero, la variación de la prevalencia de la EM con la latitud y, el segundo, la mayor prevalencia de la enfermedad entre las mujeres. Hay cada vez más evidencias de que la exposición al sol guarda una relación inversa con la prevalencia de la EM, probablemente debido a la acción de la vitamina D, aunque este hecho sólo se ha constatado en mujeres (Kragt et al., 2009). Las diferencias en la pigmentación de la piel se deben a polimorfismos en el receptor de la melanocortina (MC1R) a

través del cual la hormona estimulante de los melanocitos, MSH (*melanocyte-stimulating hormone*), produce sus efectos. Esta hormona tiene potentes efectos antiinflamatorios. Pues bien, otro estudio reciente sugiere que individuos con polimorfismos en el receptor de la MSH que producen los fenotipos rubio o pelirrojo del cabello, podrían no responder igual de bien a la hormona como los individuos con los polimorfismos que causan pelo oscuro. Por tanto, estos individuos podrían no tener los beneficios de la respuesta antiinflamatoria –u otros por identificar– relacionados con la MSH, efectos beneficiosos que podrían reducir del riesgo de un proceso autoinmune (Dwyer et al., 2008). Esto explicaría la variación de la prevalencia de la EM con la latitud, el efecto de la exposición al sol y la baja prevalencia en razas de piel oscura (MacLean y Freedman, 2009).

### 1.2.3. Implicación viral en EM

Las infecciones virales del SN pueden ser adquiridas de diversas formas: a) directamente, por traumatismos o procedimientos clínicos como la punción lumbar y la cirugía –iatrogenia–; b) a través de la diseminación de una infección primaria de localización contigua al SN –mastoiditis, sinusitis, entre otras–; c) por vía sanguínea –el mecanismo de diseminación más común–, donde el virus replica en la puerta de entrada –mucosa respiratoria, genital, digestiva, etc.–, pasa a la sangre –viremia– y por vía hematógena alcanza el SN; d) por vía neural: tras replicarse fuera del SN, el virus utiliza el axón de las células nerviosas periféricas como vía de diseminación para llegar al SNC –por ejemplo, *Herpes simplex* y virus de la rabia–.

El daño que producen los virus en el SN obedece tanto a la acción directa que ejercen los virus sobre las células nerviosas y estructuras adyacentes a las que infectan, como al daño producido por mecanismos indirectos, como son la respuesta inflamatoria e inmunológica que desarrolla el huésped.

La desmielinización inducida por una infección viral puede producirse por varias causas (Libbey et al., 2007; Stohlman y Hinton, 2001). La primera, una infección directa de la oligodendroglía que produzca muerte celular con la consiguiente degeneración de la mielina. En segundo lugar, una infección viral persistente, en presencia o ausencia de virus infeccioso, que provoque pérdida de homeostasis celular y muerte posterior de OLs. En tercer lugar, una fuerte respuesta inflamatoria contra el virus, en un contexto donde el virus se replique en otro tipo celular no oligodendrocítico, pero en el que las citoquinas y otros mediadores del sistema inmune dañen a los OLs o a la mielina. Por último, una activación de la respuesta inmune contra

OLs o mielina provocada por la infección, en la que la inflamación inducida por el virus se asocia con el procesamiento de mielina o componentes oligodendrogliales y su presentación a las células T. Alternativamente, se puede dar una situación en la que epítomos antigénicos derivados de proteínas virales exhiban suficiente homología con proteínas del huésped y disparen una respuesta inmune autorreactiva –mimetismo molecular–. En resumen, los agentes virales podrían causar desmielinización por lisis directa de los OLs; a través del daño inmunológico de OLs infectados con diferentes agentes virales; por activación inmunológica que conduce a la liberación de citoquinas, incremento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o activación de células T; o mediante mimetismo molecular.

Aunque no se ha demostrado la implicación de ningún virus concreto en la causa de la EM, existen varios estudios sobre infecciones virales del cerebro que dan lugar a alteraciones neuropatológicas que se asemejan a esta enfermedad. Los modelos virales experimentales mejor caracterizados incluyen la encefalomiелitis inducida por el virus de Theiler y la encefalomiелitis desmielinizante subaguda inducida por coronavirus.

Algunos de los hallazgos que apoyan la posible participación de virus en la etiología de la EM son los siguientes:

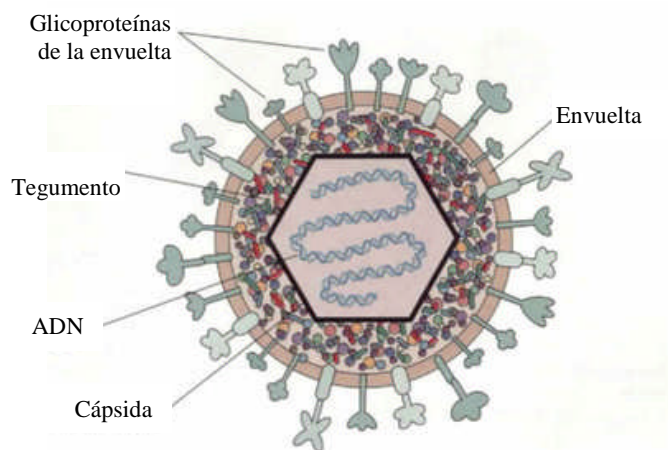
1. Se conocen infecciones víricas naturales y experimentales que causan desmielinización en animales con largos períodos de incubación, brotes y reactivaciones.
2. Se han documentado infecciones víricas en humanos que causan desmielinización del SNC de curso subagudo, con analogías a la EM.
3. Pacientes con EM presentan respuesta inmune alterada frente a ciertos virus.
4. Infecciones víricas pueden desencadenar brotes de la enfermedad.
5. En numerosas ocasiones se han aislado virus de pacientes con EM.

#### 1.2.4. El virus *Herpes Simplex* tipo 1

*Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) es un agente infeccioso ubicuo que puede causar varias infecciones en seres humanos (Whitley y Roizman, 2001). El porcentaje medio mundial de individuos adultos seropositivos para HSV-1 ronda el 90%, aunque éstos pueden no mostrar ningún síntoma. La vía de transmisión más frecuente es la saliva. En condiciones normales, se

produce una infección primaria asintomática, normalmente durante la niñez. La infección primaria se produce en células epiteliales. Posteriormente, el virus pasa de los tejidos epiteliales a los nervios adyacentes y acaba desarrollando un proceso de latencia en las neuronas de los ganglios trigéminos. Sin embargo, en ocasiones se pueden desarrollar complicaciones como la encefalitis herpética (Baringer, 2008) o enfermedades oculares crónicas, tales como keratitis y conjuntivitis (Maggs et al., 1998). Además, hay estudios que sugieren una relación entre HSV-1 y la enfermedad de Alzheimer (Itzhaki et al., 1997; Wozniak et al., 2009).

HSV-1 es un virus neurotrópico que afecta tanto al SNC como al SNP. Puede causar desmielinización focal en animales (Kastrukoff et al., 1987). Clínicamente, la presencia de OLs infectados por HSV-1 se ha constatado en casos de encefalitis aguda (Charpin et al., 1985; Skoldenberg, 1996). Existen estudios que sugieren una relación, aunque incierta, entre EM y HSV-1. Estudiando la presencia de HSV-1 y 2 en muestras de cerebro *postmortem* de individuos con EM e individuos control –enfermos de Alzheimer o Parkinson y sujetos sin enfermedades neurológicas–, se encontró que el 46% de los casos de EM y el 28% de los controles eran positivos para HSV. No obstante, la distribución del virus en materia blanca y materia gris era similar, lo que hace más incierta la participación del virus en la etiología de la enfermedad (Sanders et al., 1996).

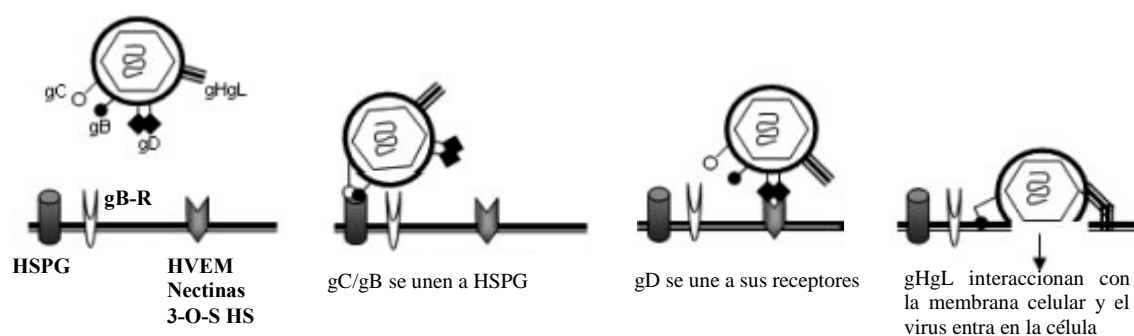


**Figura 7. Estructura de HSV-1**

HSV-1 pertenece a la familia *Herpesviridae*, y está formado por un núcleo de ADN lineal de doble cadena –core– rodeado de una cápsida icosaédrica, un material de apariencia amorfa que la rodea –tegumento– y una envuelta lipídica que contiene glicoproteínas virales (**Figura 7**). El tamaño es de unos 200 nm.

El ciclo lítico de HSV-1 comienza con la adhesión y fusión de la envuelta del virus con la membrana celular, proceso mediado por glicoproteínas virales específicas de la envuelta, como gC, gD o gB (Campadelli-Fiume et al., 2007; Reske et al., 2007). Esta fusión es independiente de pH. El cuarteto formado por gD, gB, gH y gL es necesario para la entrada del virus a la célula (Cai et al., 1988; Forrester et al., 1992; Ligas y Johnson, 1988; Roop et al., 1993). El

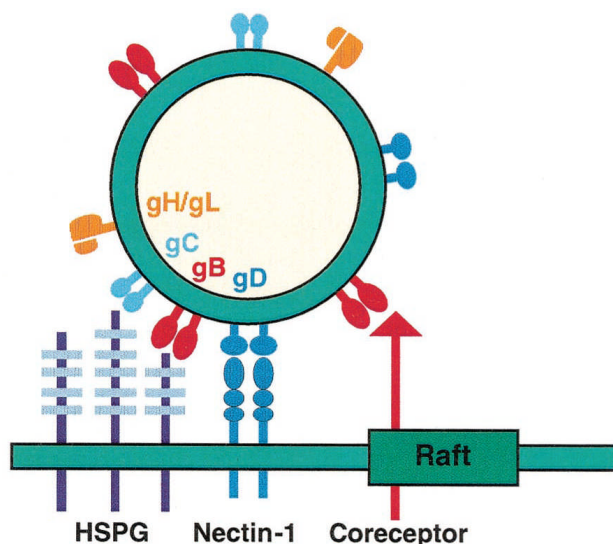
mecanismo de adsorción y entrada viral propuesto sería el siguiente: la adhesión inicial está mediada por la interacción de gB y/o gC con receptores celulares específicos como proteoglicanos heparán-sulfato (HSPGs) (**Figura 8**). Después, gB interacciona con un receptor desconocido (gB-R). A continuación, gD interacciona con otros receptores: HVEM – *herpesvirus entry mediator*, también llamado HveA, un miembro de la familia de receptores de TNF–; nectinas 1 y 2, –también llamadas HveC y HveB respectivamente; dos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, relacionadas con el receptor del virus de la Polio–; y heparán-sulfato 3-O-sulfatado (3-O-S HS). Por último, el heterodímero gH/gL interacciona con la membrana celular produciendo la entrada del virus en la célula (Campadelli-Fiume et al., 2007; Reske et al., 2007; Spear, 2004).



**Figura 8. Entrada de HSV-1.** Adaptada de (Reske et al., 2007)

Inicialmente, se consideró que la entrada de HSV que daba lugar a una infección productiva era mediante fusión independiente de pH, y que las partículas que entraban por endocitosis, y que eran detectadas dentro de endosomas, eran finalmente degradadas. No obstante, ahora se acepta que HSV puede entrar también en las células, dando lugar a infección productiva, mediante endocitosis (Nicola et al., 2003). Esta entrada requiere la presencia de las glicoproteínas virales gB, gD, y gH/gL y es dependiente de pH, ya que es necesario un pH intracelular bajo para que los viriones salgan de los endosomas en los que están contenidos y pasen al citosol (Clement et al., 2006; Nicola y Straus, 2004). Este tipo de entrada es, además, dependiente del tipo celular, ya que los mismos receptores dan lugar a los dos tipos de entrada según el huésped celular en que se produzca (Gianni et al., 2004). Así, la entrada mediante endocitosis dependiente de pH se ha constatado en células CHO/nectina-1 y HeLa. Por el contrario, en células Vero y HEp2, HSV entraría mediante fusión a pH neutro. No obstante, en células Vero, por ejemplo, en las que HSV entra principalmente por fusión independiente de pH, también tiene lugar la entrada por endocitosis, aunque se considera que ésta no da lugar a infección productiva (Koyama y Uchida,

1987). Para añadir más complejidad, en células de melanoma murino C10 se ha descrito una tercera vía, mediante endocitosis dependiente de gD pero independiente de pH (Milne et al., 2005).



**Figura 9. Modelo de adhesión de HSV en el que intervienen *rafts* lipídicos.** Tomada de (Bender et al., 2003)

Por otro lado, diferentes estudios han mostrado que los *rafts* median la entrada de HSV-1 a las células (Bender et al., 2003). Este fenómeno no es infrecuente, ya que está descrito que los *rafts* están implicados en la entrada de otros virus con envuelta, como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o Ébola. En este sentido, las primeras interacciones que se producen durante la adhesión de HSV-1 tienen lugar en dominios no-*raft*. Después, una interacción específica de gD con sus receptores –como las nectinas– permite la fusión. No obstante, una

fracción de gB se asocia también con *rafts* durante la adhesión y la entrada, mediante la interacción de esta glicoproteína con un receptor desconocido enriquecido en *rafts* (**Figura 9**).

Además, las balsas lipídicas participan también en otros procesos durante la infección de líneas celulares con HSV-1. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína del tegumento vhs (*virion host shutoff*) es insoluble en las células COS y Vero infectadas por HSV-1; es más, una subpoblación de vhs parece estar asociada a *rafts*, y esta población de *rafts* está enriquecida –es mayoritaria– en una fracción citoplásmica que contiene partículas virales maduras y en ensamblaje (Lee et al., 2003).

Tras la entrada del virus, el tegumento queda en el citoplasma liberando proteínas de gran importancia para el ciclo lítico del virus, entre ellas VP-16 –llamada también  $\alpha$ -TIFF– y vhs (Matis y Kudelova, 2001). La proteína vhs, producto del gen UL41, induce actividad ARNasa (Taddeo y Roizman, 2006; Taddeo et al., 2006). Como la transcripción viral ocurre a un ritmo mucho mayor que la celular, la síntesis de proteínas virales se ve menos afectada, por lo cual, globalmente queda inhibida la síntesis de proteínas del huésped. Además, la proteína vhs defiende la replicación viral promoviendo temporalmente la evasión a la respuesta celular

apoptótica de la célula tras la infección (Barzilai et al., 2006).

A continuación, la nucleocápsida –cuya proteína mayoritaria es VP-5– va a los poros nucleares transportada a lo largo de los microtúbulos. Este transporte está mediado por motores de dineínas, siendo ésta y su cofactor, la dinactina, necesarios para el transporte de los viriones hasta el núcleo (Dohner et al., 2002). En la membrana nuclear, el ADN viral es liberado y entra en el núcleo. Allí dicho ADN se transcribe mediante una ARNpolIII produciendo ARNm (Rajcani et al., 2004), proceso que requiere la participación de tres proteínas, VP-16 (Roizman et al., 2005) y dos factores de transcripción celulares: OCT-1 (Haigh et al., 1990) y HCF-1 (Ajuh et al., 2002). Cuando el virus entra en la célula, VP-16 va al núcleo y forma un complejo con OCT-1 y HCF-1 que se une a secuencias específicas y actúa como un potente activador de la transcripción de genes inmediatamente tempranos o genes  $\alpha$ .

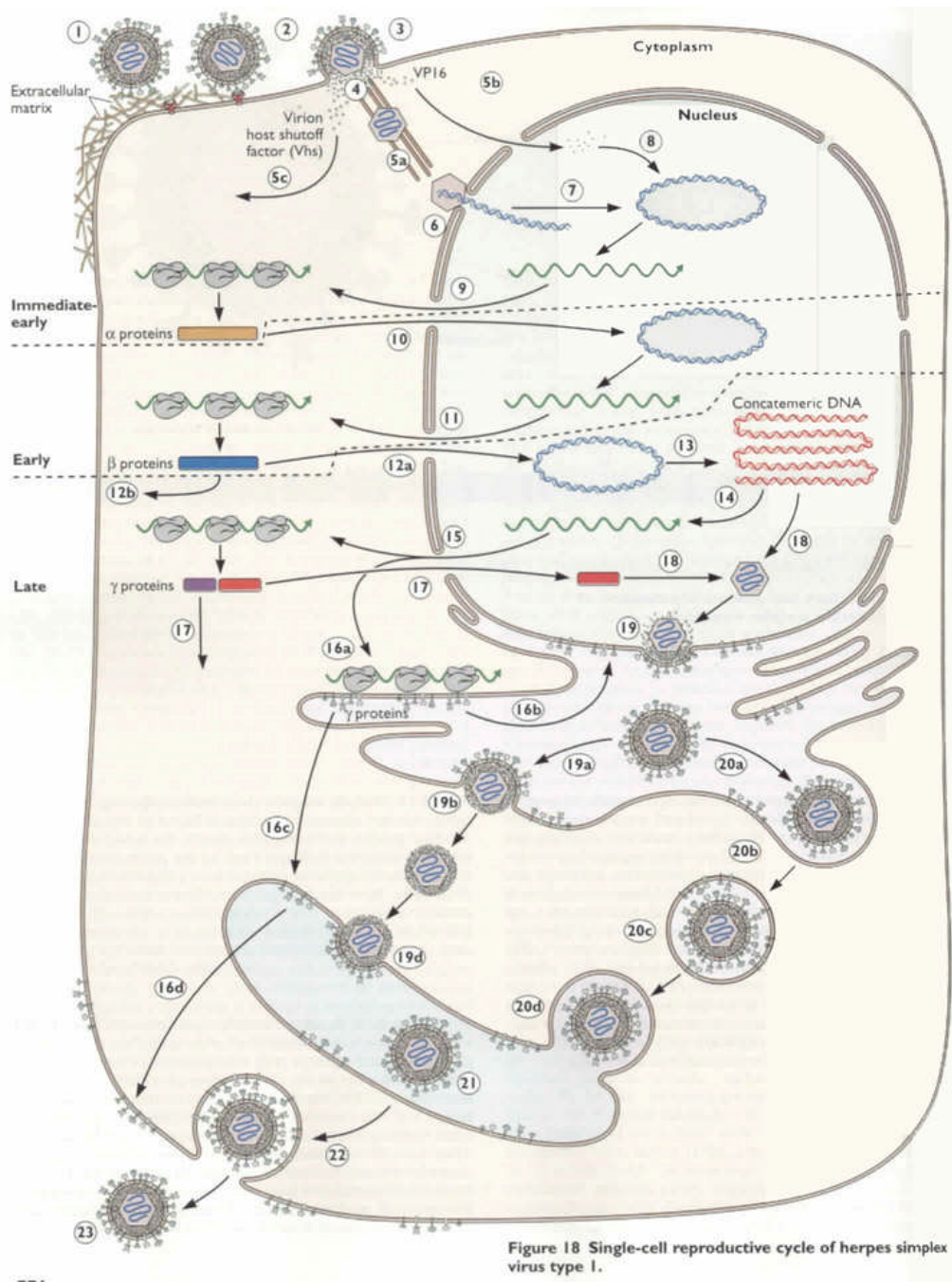
En la fase  $\alpha$  del ciclo se transcriben 5 genes que codifican 5 proteínas inmediatamente tempranas: ICP-0, ICP-4, ICP-22, ICP-27 e ICP-47. En la fase  $\beta$ , los genes  $\beta$  codifican proteínas necesarias para la replicación del ADN –proteínas tempranas–, incluyendo ADNpol, primasa, helicasa, ribonucleótido-reductasa, entre otras (Knopf, 2000). Aunque hay tres orígenes de replicación, parece que sólo se necesita uno. Dicha replicación tiene lugar mediante círculo rodante, proceso en el cual el ADN se va cortando con nucleasas virales que reconocen señales específicas en el ADN lineal. La replicación es necesaria para la transcripción de los genes  $\gamma$ .

En la fase final, los genes  $\gamma$  codifican las proteínas necesarias para formar las cápsidas y el tegumento de la progenie –proteínas tardías–. Aunque las proteínas se sintetizan en el citoplasma, las cápsidas y el tegumento se ensamblan en el núcleo. Del mismo modo, el empaquetamiento del ADN en las cápsidas ocurre también en el núcleo (Mettenleiter et al., 2006). En cuanto a la salida del virus, el modelo más aceptado (**Figura 10**, pasos 20a-21) es el que sostiene que los viriones pasan del núcleo al retículo endoplásmico y de aquí al citoplasma, perdiendo en este proceso la envuelta. A continuación, se adquiere nuevamente la envuelta en la red *trans*-Golgi (Turcotte et al., 2005). Finalmente, mediante un mecanismo de fusión, el virión maduro atraviesa la membrana celular.

En neuronas, también se ha visto que la proteína de la cápsida UL35 se une a la cadena ligera de dineína. No obstante, el mecanismo de transporte anterógrado –hacia la membrana– es más controvertido. Las hipótesis más aceptadas sugieren que las cápsidas desnudas completan el



ensamblaje en los conos de crecimiento axonal y las varicosidades (Diefenbach et al., 2008).



**Figura 10. Ciclo de HSV-1.** Tomada de (Flint et al., 2000)

Después de la infección de los tejidos epiteliales –infección primaria–, HSV-1 infecta los nervios sensoriales que inervan esos tejidos y establece una infección latente (Divito et al., 2006; Efsthathiou y Preston, 2005). El virus se desplaza por los axones en dirección ascendente

estableciéndose en los ganglios trigéminos en forma de episomas asociados a nucleosomas (Deshmane y Fraser, 1989). Aunque la mayoría de los genes virales dejan de expresarse durante la infección latente, algunas neuronas infectadas expresan un gen codificado por distintas regiones del genoma: el transcrito asociado a latencia o gen LAT (*latency associated transcript*) (Kent et al., 2003). Se ha propuesto que las neuronas que expresan genes líticos mueren, mientras que las que expresan genes LAT pasan a un estado de latencia (Knipe y Cliffe, 2008).

Durante la infección productiva, el ADN de HSV está relativamente libre de nucleosomas, es decir, no está asociado con histonas (Leinbach y Summers, 1980; Wang et al., 2005) a excepción de un bajo grado de asociación a la histona H3 (Herrera y Triezenberg, 2004). Por el contrario, durante la infección latente, el ADN viral tiene una estructura nucleosomal (Deshmane y Fraser, 1989). Parece ser que, a medida que progresa la infección de las neuronas de los ganglios trigéminos, los promotores de los genes líticos van progresivamente asociándose con la histona H3. A continuación, los genes LAT provocan la metilación de la lisina 9 en la histona H3 (Wang et al., 2005). Esta modificación epigenética está involucrada en el proceso de formación de cromatina inactiva o heterocromatina y, por tanto, en el silenciamiento de genes.

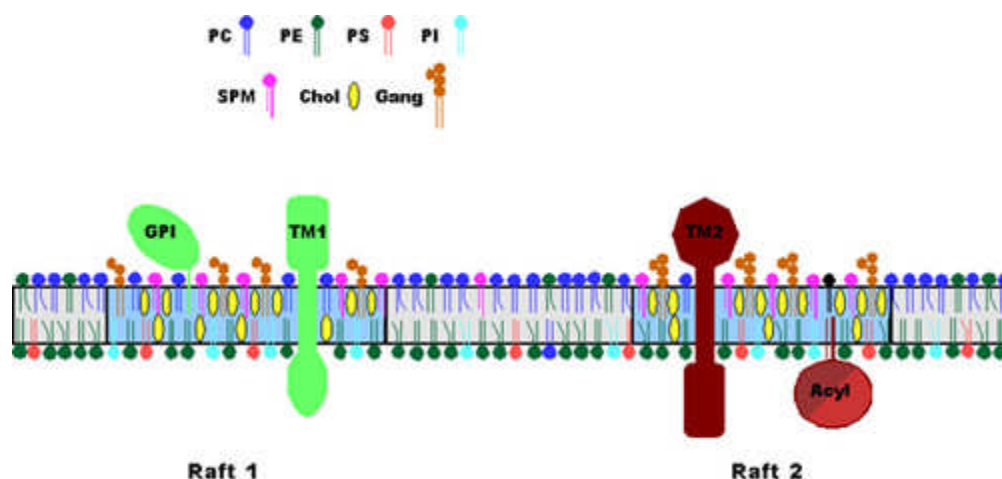
En resumen, parece ser que HSV-1 manipula la maquinaria celular de modificación de histonas y promueve la formación de heterocromatina en el ADN viral, silenciando así los genes que provocan el ciclo lítico e induciendo latencia (Knipe y Cliffe, 2008).

Cerca del 40% de los individuos seropositivos son susceptibles a reactivación viral. Ésta tiene lugar en respuesta a estímulos como fiebre, estrés emocional, etc. Cuando se produce la reactivación viral, tiene lugar una limitada replicación en la neurona y HSV-1 viaja hacia los focos de infección primarios, donde vuelve a producir una infección lítica. No está claro si este proceso conlleva muerte neuronal. Aunque durante dicha reactivación, los viriones viajan a los focos de infección primarios, algunos pueden ir en dirección contraria y alcanzar el SNC a través de las sinapsis.

### 1.3. LA FAMILIA MAL DE PROTEOLÍPIDOS

#### 1.3.1. Balsas lipídicas (*lipid rafts*)

El modelo tradicional de membrana celular de Singer y Nicolson, que concebía las proteínas de membrana como icebergs flotando en un mar de lípidos, ha cambiado en la última década, y hoy se considera que hay unas estructuras en este mar de lípidos que imponen una organización en la distribución de las proteínas de la bicapa (Brown y London, 1998; Day y Kenworthy, 2009; Simons y Ikonen, 1997). Estas estructuras se llaman balsas lipídicas o *lipid rafts*. Los *rafts* son microdominios de membrana con una alta concentración de esfingolípidos y colesterol –en fase de gel– inmersas en el ambiente rico en fosfolípidos típico de las membranas biológicas –en fase de líquido cristal– (**Figura 11**). Los *rafts* son insolubles en detergentes no iónicos y se encuentran, además de en la membrana plasmática, también en las membranas intracelulares.



**Figura 11. Estructura de las balsas lipídicas.** PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; SPM: Esfingomielina; Gang: gangliósidos; Chol: colesterol; GPI: proteínas ancladas por glicofosfatidilinositol; TM: proteínas transmembrana; Acyl: proteínas aciladas;

Se ha establecido la importancia de las balsas lipídicas en la maquinaria de tráfico de membranas, –especialmente en el transporte de vesículas en células polarizadas (Hoekstra et al., 2003)–, entre las que se encuentran células epiteliales, neuronas, células de Schwann y OLs. Otras funciones de los *rafts* son la transducción de señales, la endocitosis y la entrada de patógenos. Además, estos microdominios pueden proporcionar señales para el inicio de la mielinización, y servir como mecanismo de transporte de proteínas a la vaina de mielina (Debruijn y Harauz, 2007; Lee, 2001). Las proteínas CNP y MOG se han aislado de DRMs (*detergent resistant membranes*, membranas resistentes a detergentes) (Kim y Pfeiffer, 1999).

La existencia de *rafts* fue hipotetizada en 1988 (Simons y van Meer, 1988; van Meer y Simons, 1988) aunque las denominadas caveolas se observaron mucho antes (Palade y Bruns, 1968; Yamada, 1955). Las caveolas son *rafts* con forma de invaginaciones de la membrana plasmática que llevan a cabo diversas funciones de señalización. Se encuentran en distintos tipos celulares, sobre todo células endoteliales, pero no existen en tejidos neuronales.

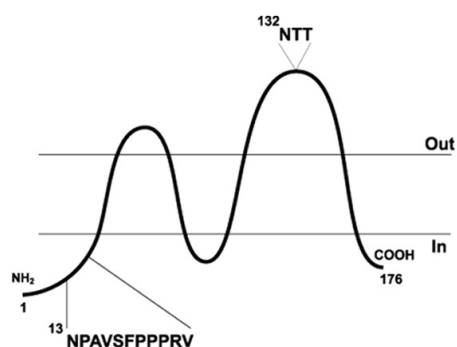
### 1.3.2. La familia MAL

En 1987 se identificó en células T una proteína transmembrana de 17 kDa a la que se llamó MAL (Alonso y Weissman, 1987) implicada en procesos de señalización en células T activadas. Además de en linfocitos T maduros o células epiteliales, la proteína MAL se expresa en OLs y células de Schwann. En 1995 se identificó en OLs de rata la proteína MVP17 –*myelin vesicular protein*, de 17 kDa–, que reveló una alta homología con la proteína MAL humana (Kim et al., 1995). Asimismo, la proteína MAL canina VIP17 (Zacchetti et al., 1995) es casi idéntica a la humana. Ahora, dentro de esta prolífica familia se incluyen varias proteínas, entre las que están MAL, MAL2, BENE, MYADM y plasmolipina. MAL pertenece a la superfamilia tetraspaninas, descubierta en 1990, y que son un grupo de proteínas hidrofóbicas con cuatro dominios transmembrana y dos bucles extracelulares, uno grande y otro pequeño, ambos con residuos conservados. Está descrito que MAL está asociada a balsas lipídicas y que es necesaria para el transporte directo de proteínas apicales en células epiteliales polarizadas (Alonso y Millan, 2001; Cheong et al., 1999; Martin-Belmonte et al., 2000). Además, se ha sugerido que en OLs participa en el transporte vesicular de proteínas y lípidos a la membrana de mielina (Frank et al., 1998).

Durante su formación, las proteínas asociadas a la mielina tienen que ser clasificadas y transportadas a regiones específicas de la membrana, siendo MAL una de las proteínas implicadas en este proceso. MAL forma parte de las proteínas de mielina y de ahí la adaptación posterior que algunos autores hicieron de la sigla MAL: *myelin and lymphocyte protein*. Esta proteína podría funcionar también como un componente estructural necesario para la estabilización de la mielina (Schaeren-Wiemers et al., 1995). En OLs, MAL está localizada principalmente en mielina compacta, paranodos e incisuras de Schmidt-Lanterman (Erne et al., 2002). Además, parece ser que MAL tiene un papel fundamental en el mantenimiento de las interacciones axón-glía (Schaeren-Wiemers et al., 2004), ya que participa en la estabilización de los paranodos.

### 1.3.3. La proteína MAL2

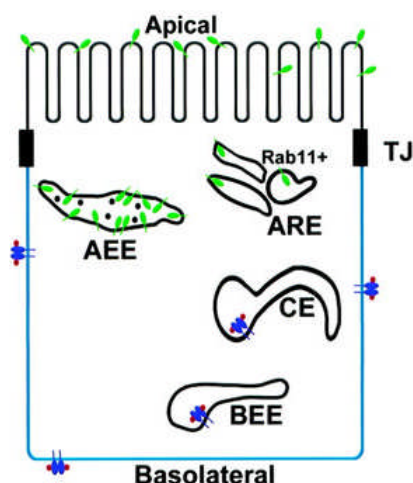
En 2001 se identificó otro miembro de la familia MAL, una proteína de 19 kDa llamada MAL2. (Wilson et al., 2001) (**Figura 12**). La expresión de MAL2 se ha encontrado en varias líneas celulares epiteliales –como HepG2, Caco-2 o MDCK– y en muchos tipos de tejidos humanos:



**Figura 12. Estructura esquemática de la proteína MAL2.** Tomada de (de Marco et al., 2002)

epitelios del estómago, intestino, hígado, páncreas, pulmón o próstata. También se encuentra en neuronas, mastocitos o células dendríticas. (Marazuela et al., 2004). En la línea hepática HepG2, MAL2 reside en balsas lipídicas y es necesaria para la ruta de transporte indirecto, ya que su eliminación bloquea la transcitosis de CD59 –una molécula anclada a glicofosfatidil inositol (GPI) que viaja mediante transporte indirecto en su ruta hacia el dominio

apical- y del receptor de la Ig polimérica (pIgR) (de Marco et al., 2002). En esta línea celular, MAL2 se ha encontrado en un compartimento endosomal subapical localizado debajo del citoesqueleto de actina canalicular (de Marco et al., 2006). Este compartimento positivo para MAL2 se identificó posteriormente como el compartimento subapical o SAC (*Subapical Compartment*).



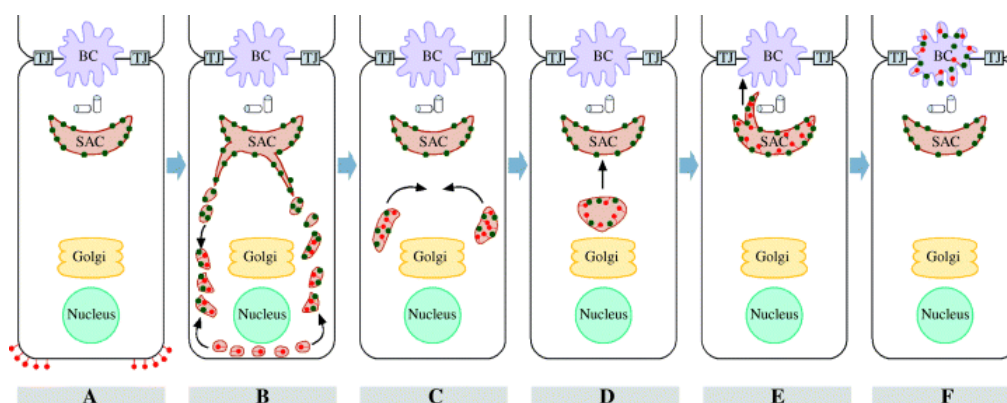
**Figura 13. Representación esquemática del ARE.** Adaptada de (Ramalingam et al., 2002)

El SAC (Ihrke et al., 1998; van IJzendoorn y Hoekstra, 1998), que fue descrito por primera vez en hepatocitos (Ihrke et al., 1998), es un centro de tráfico subcelular donde convergen las rutas endocíticas procedentes de los dominios apical y basolateral. En otras células epiteliales el SAC se denomina endosoma de reciclaje apical (ARE, *Apical Recycling Endosome*) (Apodaca et al., 1994) (**Figura 13**). No obstante, hay autores que denominan ARE a la parte más distal del SAC que estaría formada por una población de vesículas con forma de copa (Gibson et al., 1998) y funcionaría como un sub-compartimento

integral dependiente de microtúbulos. Por ello, no se ha alcanzado aún un consenso en cuanto a la relación que existe entre ambos endosomas y a la nomenclatura a utilizar. De hecho, hay

autores que identifican el SAC con el compartimento de reciclaje endocítico (ERC, *endocytic recycling compartment*), endosoma común (CE, *common endosome*) o endosoma de reciclaje común (CRE, *common recycling endosome*). El ARE/SAC se necesita para la generación y el mantenimiento de la polaridad en células epiteliales (Hoekstra et al., 2004) y, en él, las moléculas se clasifican y se envían, bien al dominio del que proceden –reciclaje– o bien al dominio opuesto –transcitosis– (Maier y Hoekstra, 2003). Aunque hay diferencias claras en la morfología del SAC entre los distintos tipos celulares epiteliales, su apariencia general está caracterizada por una red tubulovesicular pericentrosomal que se agrupa en la región apical y se extiende hacia la periferia de la célula. Lejos de ser un compartimento simple, varios estudios apuntan a que el SAC está subcompartimentalizado (Wustner et al., 2002) y que tiene distintos subdominios (Hoekstra et al., 2004).

MAL2 ha revelado ser una proteína altamente dinámica. En un estado estático, en células polarizadas HepG2, se localiza principalmente en el SAC (**Figura 14A**). Moléculas transcitóticas como CD59 e IgA residen transitoriamente en este compartimento y colocalizan con MAL2 antes de su tránsito final a la superficie apical. Después de la internalización de CD59 desde la superficie basolateral, MAL2 se redistribuye en unas estructuras tubulovesiculares que emergen del SAC y en otras estructuras citoplásmicas para encontrarse con las moléculas de CD59 y formar agrupaciones endosomales positivas para MAL2 y CD59 (**Figura 14B**). A continuación, esas agrupaciones periféricas van gradualmente fusionándose para formar endosomas más grandes que migran a la región apical (**Figura 14C**). Después, los endosomas se fusionan con el SAC positivo para MAL2 (**Figura 14D**) para, finalmente, transferir las moléculas de CD59 a la membrana del canalículo a través de extensiones tubulares que emergen de ese compartimento (**Figura 14E-F**).



**Figura 14. Modelo esquemático de la dinámica de MAL2 y CD59 durante el transporte transcitótico de CD59.** Tomada de (de Marco et al., 2006). Rojo, CD59; verde, MAL2.

#### 1.3.4. Endosomas de reciclaje

La compartimentalización propia de las células eucarióticas requiere mecanismos de transporte de proteínas y lípidos entre distintos orgánulos altamente dinámicos. El intercambio de material entre los compartimentos de las rutas endocítica y secretora requiere la formación de compartimentos intermediarios. El ERC, también llamado endosoma de reciclaje pericentrosomal o perinuclear, es uno de esos orgánulos que funcionan en el reciclaje de material endocitado de vuelta a la superficie celular. El ERC, que está involucrado en el reciclaje de lípidos y proteínas en células no polarizadas, es un compartimento ligeramente ácido (pH 6.4-6.5) con morfología tubulovesicular que, en muchos tipos celulares se posiciona en torno al centrosoma (Horgan et al., 2007). Los miembros de la subfamilia de GTPasas Rab 11 –Rab11a, Rab11b y Rab 25– están enriquecidos –mayoritariamente presentes– en el ERC y controlan el tráfico a través de esta subpoblación de endosomas. Este endosoma lleva a cabo una actividad de tráfico muy intensa conectando las rutas endocíticas y exocíticas. Tiene la capacidad de clasificar moléculas hacia diferentes destinos, como por ejemplo la red trans-Golgi, aunque la función más caracterizada es el reciclaje hacia la membrana plasmática. Además, parece ser un compartimento altamente dinámico, y se puede formar o expandir en respuesta a los requerimientos de la célula a lo largo de sus estados fisiológicos.

En células no polarizadas, el reciclaje de proteínas a la superficie celular, por ejemplo el receptor de transferrina, puede ocurrir mediante dos rutas distintas. El proceso más rápido consiste en el reciclaje directo desde endosomas tempranos (EE, *early endosomes*) hasta la membrana plasmática (Hao y Maxfield, 2000), mientras que el reciclaje a través del ERC pericentriolar es mucho más lento (Mayor et al., 1993). De hecho, una fracción importante de la transferrina internalizada se concentra en el ERC. La transferrina, a diferencia de la mayoría de los ligandos no se libera de su receptor en el ambiente ácido de los endosomas de clasificación. En estos endosomas se liberan los átomos de hierro, que van al citoplasma, pero la apo-transferrina queda unida a su receptor hasta que se encuentra en el pH neutro del medio extracelular.

Distintos procesos celulares, entre ellos la polarización, afectan a la morfología y funcionamiento del ERC, que puede derivar en otras estructuras: por ejemplo, los compartimentos vesiculares de adipocitos y cardiomiocitos y el ARE/SAC de las células epiteliales parecen generarse a partir del ERC (Saraste y Goud, 2007). No obstante, todavía no está del todo clara la relación que existe entre el endosoma común de las células polarizadas, –

que correspondería al ERC de las células no polarizadas– y el ARE/SAC, aunque parece que puede existir una relación estrecha, tanto morfológica como funcional.

### 1.3.5. Polarización de OLs

Tal y como se ha señalado anteriormente, durante su desarrollo, los OLs maduran a través de una serie de estados diferentes caracterizados por sus correspondientes marcadores de diferenciación: células precursoras neuroepiteliales, progenitores O-2A u OPCs, pre-OLs, OLs inmaduros, OLs maduros no mielinizantes y OLs maduros mielinizantes (Gielen et al., 2006). La diferenciación de los OLs tiene muchas similitudes con la diferenciación de las células epiteliales (Trapp et al., 1997). Al igual que la membrana apical de las células epiteliales, la mielina tiene un alto contenido en GSLs y colesterol (de Vries et al., 1998); (de Vries y Hoekstra, 2000). Por tanto, aunque los OLs mielinizantes no forman los dominios apical y basolateral típicos de las células epiteliales, separados por uniones estrechas, sí presentan dominios de membrana claramente distintos y se consideran, por tanto, células polarizadas. Diversos estudios han sugerido que los OLs mielinizantes pueden usar mecanismos de clasificación –*sorting*– semejantes a los de las células epiteliales polarizadas (Kroepfl y Gardinier, 2001; Simons et al., 2000). También se ha sugerido que la transcitosis puede ser un posible mecanismo de tráfico de membranas durante la mielinización (Kramer et al., 2001).

Además de los dos dominios presentes en los OLs polarizados –la membrana plasmática y la mielina– ésta, como se ha comentado antes, tiene a su vez varios sub-dominios. Para generar este complejo sistema de membranas, se tienen que sintetizar y transportar a su lugar adecuado grandes cantidades de proteínas y lípidos. Además es necesaria también mantener un equilibrio permanente entre la síntesis de mielina y su renovación. Por ello, el estudio de los procesos de tráfico celular durante el proceso de diferenciación y polarización de los OLs es fundamental para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a las patologías que acompañan a las enfermedades desmielinizantes.



## OBJETIVOS

---



## 2. OBJETIVOS

La idea general del presente trabajo de Tesis Doctoral parte del interés que ha despertado la relación entre procesos desmielinizantes con agentes virales. Dado que los herpesvirus han sido algunos de los principales factores ambientales orgánicos implicados en la etiología de enfermedades desmielinizantes como la EM, se optó por un miembro de este grupo, un virus neurotrópico que podría estar implicado en procesos desmielinizantes: *Herpes simplex* tipo 1. Pocas publicaciones han abordado estudios *in vitro* de la infección de células formadoras de mielina con HSV-1. De ellos, la mayoría se ha realizado con células de origen murino. Por tanto, se consideró conveniente que los sistemas celulares utilizados incluyeran células humanas.

Los objetivos concretos de esta tesis se resumen en los siguientes puntos:

1. Estudiar la susceptibilidad de células oligodendrocíticas a la infección por HSV-1. El primer objetivo de esta Tesis consistió, por tanto, en la caracterización de la infección: efecto citopático, productividad viral, efectos metabólicos, tipo de muerte inducida e influencia de la diferenciación celular sobre el curso de la infección.
2. Investigar la posible relación del virus con la maquinaria de tráfico celular. Los OLs mielinizantes son células polarizadas y, dado que el ARE/SAC es clave para el mantenimiento de la polaridad celular y el tráfico de proteínas y lípidos, se consideró oportuno estudiar si HSV-1 estaba relacionado con dicho compartimento en algún momento de su ciclo viral.
3. Caracterizar la proteína MAL2 en OLs. MAL2 es una proteína de *rafts* residente en el ARE/SAC y está considerada como un marcador de dicho compartimento. Hasta este momento no se había abordado el estudio de MAL2 en células del sistema nervioso. Por tanto, uno de los primeros pasos de esta tesis consistió en la caracterización de MAL2 en células oligodendrocíticas y la descripción del compartimento positivo para MAL2 en dichas células.



## MATERIALES Y MÉTODOS

---



### 3.1. MATERIALES

#### 3.1.1. Anticuerpos y reactivos

El anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD59 (MEM-43/5) fue generosamente proporcionado por el Dr. Vaclav Horejsi (Instituto de Genética Molecular, Praga, República Checa). El anticuerpo monoclonal que reconoce el marcador O1 fue comprado a Chemicon (Temecula, CA, USA). Los anticuerpos secundarios anti-IgG acoplados a peroxidasa fueron suministrados por Pierce (Rockford, IL, USA). Los anticuerpos secundarios Alexa 488, Alexa 594, Alexa 555 y Alexa 647 se obtuvieron de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Los anticuerpos anti-Rab11a,  $\alpha$  y  $\gamma$ -tubulina, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonato (CHAPS), G418 sulfato, Poly-DL-ornitina, insulina, triiodotironina (T3), transferrina (Tf), selenito sódico, putrescina, progesterona, dibutiril-AMP cíclico (dbcAMP), isobutil-3,3-metilxantina (IBMX), la subunidad B de la toxina colérica de *Vibrio cholerae* (CTxB) conjugada a FITC, dimetilsulfóxido (DMSO), dodecil-sulfato sódico (SDS), suero fetal bovino (SFB) y DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El anticuerpo 25H8 fue generosamente proporcionado por el Dr. Ignacio Sandoval (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid). El anticuerpo MCA685S anti-MBP fue de Serotec (Oxford, UK), Mowiol, de Calbiochem (Merck Chemicals, Germany), y Jet-PEI de Polyplus-transfection (Illkirch, France). Los anticuerpos policlonales anti-HSV-1 anti-gB, anti-gD, anti-gDB, anti-ribonucleótido reductasa y LP11, un anticuerpo monoclonal anti-gH (Buckmaster et al., 1984), fueron cedidos por el Dr. Enrique Tabarés (Universidad Autónoma de Madrid). El anticuerpo policlonal anti-HSV-1 fue cedido por el Dr. Fernando Valdivieso (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid). Los anticuerpos anti-TGN-46 y anti-CD63 fueron cortesía del Dr. Alberto Fraile (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid). WGA y el anticuerpo anti-nectina-1 fueron donados por la Dra. Covadonga Alonso (INIA, Madrid)

El anticuerpo policlonal P239 anti-MAL2 –desarrollado por el Dr. Juan F. Aranda– fue una donación del Dr. Miguel Ángel Alonso (CBM, Madrid). El péptido correspondiente a los aminoácidos 13-28 de la molécula MAL2 de rata (NPAVSFPAPRITLPAG) fue acoplado a *keyhole limpet hemocyanine* (KLH) y usado para inmunizar conejos mediante los protocolos estándar. La especificidad del anticuerpo así obtenido, P239, se demostró mediante microscopía de fluorescencia e inmunotransferencia de células COS-7 que expresaban MAL2.

### 3.1.2. Líneas celulares

La línea oligodendrocítica Oli-neu (Jung et al., 1995) es una línea precursora murina cedida generosamente por el Dr. Hugo Cabedo (Universidad Miguel Hernández, Murcia) con el permiso de la Dra. Jacqueline Trotter (Universidad de Heidelberg, Alemania). La línea de origen humano HOG, establecida a partir de un oligodendroglioma extraído quirúrgicamente (Post y Dawson, 1992), nos fue generosamente proporcionada por el Dr. Anthony T. Campagnoni (UCLA, Universidad de California, USA). La línea oligodendroglial humana KG-1C (Miyake, 1979), que fue proporcionada por el Dr. Antonio Alcina (Instituto de Parasitología López Neira, Granada), procede de un glioma cerebral mixto obtenido quirúrgicamente de un varón de 13 años de edad. La línea celular Vero (ATCC CCL 81) procede de células epiteliales de riñón de mono verde africano adulto.

Las células se cultivaron en placas de Petri con medio de crecimiento (MC), formado por DMEM suplementado con 10% de SFB, penicilina (50 U/ml) y estreptomicina (50 µg/ml), a 37 C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para inducir la diferenciación de la línea HOG, las células se cultivaron en medio de diferenciación (MD), formado por DMEM sin SFB, suplementado con los mismos antibióticos y 50 µg/ml de apo-transferrina, 0.5 mg/l de insulina, 16.1 mg/l de putrescina, T3 30 nM y selenito sódico 30 nM. A este medio de diferenciación se le añadió dbcAMP e IBMX –inhibidor de fosfodiesterasas que reduce la degradación del dbcAMP–, ambos a una concentración final de 0.5 mM. El medio utilizado para estimular la diferenciación de la línea Oli-neu estaba formado por DMEM sin SFB, suplementado con los mismos antibióticos y 100 µg/ml de apo-transferrina, 5 mg/l de insulina, 16.1 mg/l de putrescina, 60 ng/ml de progesterona, T3 60 nM y selenito sódico 30 nM. Las células fueron cultivadas en este medio en presencia de dbcAMP 1 mM.

Las células se conservaron mediante criogenización en tubos Costar estériles de 2 ml a una concentración de  $3.5 \times 10^6$  células/ml, usando como crioprotector DMSO al 10%. Tras 24 horas a -70°C, se mantuvieron a -196°C en nitrógeno líquido.

### 3.1.3. Cepas víricas

Se ha utilizado la cepa F del virus *Herpes simplex* tipo 1, HSV 1 (F).



## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Obtención y conservación del stock vírico

Para la obtención del stock vírico se utilizaron células Vero. Monocapas subconfluentes de estas células cultivadas en frascos Falcon de 175 cm<sup>2</sup>, fueron inoculadas con un stock vírico cuyo título era de  $1.2 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> (*tissue culture infectious dose*) por ml, a una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 0.05. El volumen de inóculo se calculó conforme a la relación 1 ml por cada 25 cm<sup>2</sup>. Tras una hora de adsorción, se completó el medio del cultivo, manteniéndose a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> durante 48 horas, aproximadamente.

Cuando se observó efecto citopático (ECP) generalizado se procedió a la recogida del virus. Para ello, se resuspendieron las células simplemente por agitación dejándose después durante un mínimo de 15 minutos a 4°C, tras lo cual se centrifugaron a 6000 g durante 10 minutos a 4°C. Se resuspendió el sedimento en medio al 20% de SFB inactivado y se sonicó en baño de agua a 10°C durante 15 minutos. Después, se volvió a centrifugar a 6000 g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar los restos celulares, y se congeló el sobrenadante a -70°C.

### 3.2.2. Transfección transitoria

La línea Oli-neu fue transfectada transitoriamente con una construcción formada por la proteína verde fluorescente (GFP) unida al extremo amino-terminal de MAL2 (GFP-MAL2). Esta construcción ya se ha descrito previamente (de Marco et al., 2006).

Veinticuatro horas antes de la transfección transitoria, se sembraron en MC  $3 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de cultivo de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA) que contenían cristales cubreobjetos redondos tratados con 0.5 mg/ml de poli-DL-ornitina en tampón borato. Las células fueron transfectadas transitoriamente con 3 µg de ADN mediante el reactivo JetPEI, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con el ADN durante 24 horas tanto en MC como en MD, y permanecieron con esos mismos medios un día más antes de fijarlas y analizarlas mediante microscopía de fluorescencia.

### 3.2.3. Transfección estable

La línea HOG fue transfectada establemente con la misma construcción, GFP-MAL2, usada para transfectar la línea Oli-neu. En este caso, veinticuatro horas antes de la transfección, se sembró un millón de células en placas de cultivo de 100 mm de diámetro (P100) con MC. Las células se transfectaron con 8 µg of ADN, usando el reactivo JetPEI, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con el ADN durante 24 horas en MC y, 48 horas después de la transfección, se seleccionaron los transfectantes estables mediante la adición al medio de cultivo de 1 mg/ml de geneticina (G418). Después de 4 semanas, se seleccionaron los clones resistentes al antibiótico y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia, seleccionando los transfectantes que expresaban GFP. Esos clones positivos para GFP se siguieron cultivando en medio libre de geneticina.

La transfección estable de la línea HOG con MAL-diHcRed –una construcción formada por el gen de MAL unida a diHcRed, una proteína dimerica roja fluorescente– se llevó a cabo de la misma manera, seleccionando los clones que expresaban establemente MAL-diHcRed o GFP-MAL2 y MAL-diHcRed simultáneamente. Estos clones se denominaron, respectivamente, MAL-diHcRed/HOG y GFP-MAL2/MAL-diHcRed/HOG.

### 3.2.4. Aislamiento de balsas lipídicas (*rafts*)

Para el aislamiento de *rafts*, las células, diferenciadas o no, se trataron tanto con el detergente no iónico Triton X-100 como con CHAPS a 4°C y se centrifugaron en gradientes de sacarosa. Los *rafts* o DIGs se prepararon usando gradientes discontinuos. Placas de cultivo de P100 confluentes se lavaron con PBS y se lisaron durante 30 minutos con 1 ml de Triton X-100 1% en TNE (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) o CHAPS 20 mM en TE (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA) a 4°C. El lisado se extrajo de las placas de cultivo y se homogeneizó pasando la muestra por una aguja de tamaño 22 Gauge diez veces. La centrifugación se realizó usando gradientes discontinuos, que consistieron en una capa de 4 ml con el lisado celular en 40% de sacarosa, cubierta con 6 ml de sacarosa al 30% y encima otra capa de sacarosa al 5%. Los gradientes se centrifugaron durante 20 horas a 39.000 rpm a 4°C en un rotor Beckmann SW 41Ti. Tras la centrifugación, se recogió la banda opalescente que contiene los *rafts* –fracción insoluble–, que migra a la interfase entre las capas de sacarosa del 5 y el 30%. Las proteínas citosólicas y las proteínas que se solubilizan se recogieron también de la capa de sacarosa del 40% –fracción soluble–.

### 3.2.5. Análisis mediante inmunotransferencia

Básicamente, esta técnica ha consistido en la separación de polipéptidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, la posterior transferencia a membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore), e incubación con anticuerpos que reconocen las proteínas a estudiar, para, posteriormente, revelarlas con un agente quimioluminiscente.

Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) bajo condiciones reductoras y, tras equilibrar los geles y las membranas en solución de transferencia de Bjerrum (Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.037%, metanol 20%, pH 9.2), las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF mediante un dispositivo de transferencia en semi-seco (Trans-blot, de Bio-Rad). Tras bloquear las membranas con leche desnatada en polvo al 5% y Tween 20 al 0.05% en PBS, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente. Tras varios lavados con Tween 20 al 0.05% en PBS, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa, se lavaron nuevamente y se revelaron usando un kit de quimioluminiscencia para *Western blot* (ECL, Amersham, Little Chalfont, UK).

### 3.2.6. Inmunofluorescencia

Las células se cultivaron sobre cristales cubreobjetos redondos tratados con 0.5 mg/ml de poli-DL-ornitina en tampón borato. Posteriormente, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 20 minutos, se lavaron con PBS y se trataron con glicina 10 mM durante 5 minutos para bloquear los grupos aldehído libres. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.2% en PBS durante 5 minutos sobre hielo –para evitar solubilización de proteínas de *rafts*–, se lavaron con PBS y se bloquearon con seroalbúmina bovina (BSA) al 3% en PBS durante 30 minutos.

Para realizar dobles marcajes, las células se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el primer anticuerpo primario, se lavaron varias veces en PBS y se incubaron en oscuridad durante otra hora a temperatura ambiente con el primer anticuerpo secundario. Después de lavar las células con PBS, se repitió el proceso con los segundos anticuerpos primario y secundario. Los controles incluyeron incubaciones sin anticuerpos primarios –control de inespecificidad del anticuerpo secundario–, incubaciones con sueros pre-inmunes y controles de autofluorescencia.

Después de los lavados correspondientes, los cristales se montaron con Mowiol. Según se indica en cada caso, las imágenes se obtuvieron usando un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara CCD o un sistema de barrido láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert 200 (Zeiss). Para cuantificar la fluorescencia, las imágenes confocales se analizaron con el software FIJI-ImageJ, y los datos fueron procesados estadísticamente.

### 3.2.7. Citometría de flujo

Para el análisis mediante citometría de flujo, las células se disociaron incubándolas durante un minuto en 0.05% tripsina/0.1% EDTA (Invitrogen) a temperatura ambiente y se lavaron y fijaron en 4% PFA durante 15 minutos. A continuación, las células fijadas se lavaron con PBS y se resuspendieron en  $\text{Ca}^{2+}$  50 mM en PBS. Las células se analizaron con el equipo Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter).

### 3.2.8. Ensayos de transcitosis

Para analizar el transporte transcitótico de CD59, las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 (8  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 30 minutos a 4°C, se lavaron, se incubaron a 37°C y se fijaron a distintos tiempos. Posteriormente, las células se procesaron para su análisis mediante microscopía de fluorescencia. El anticuerpo unido a CD59 fue detectado usando un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 555.

Para estudiar la distribución de GFP-MAL2, CD59 y Tf en los compartimentos endosomales de las células GFP-MAL2/HOG, los cultivos se incubaron en MC y MD con el anticuerpo anti-CD59 durante 30 minutos a 4°C, se lavaron y se incubaron de nuevo durante 90 minutos a 18°C. A continuación, se incubaron durante 60 minutos en MC y MD con holo-transferrina humana (0.5 mg/ml) a 18°C. Después, las células se fijaron, se permabilizaron y se procesaron para su análisis mediante microscopía confocal. La Tf fue detectada mediante un anticuerpo policlonal de conejo anti-Tf y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 647.

Para estudiar la polarización de las células y la distribución de los marcadores apicales y basolaterales, las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 y con Tf a 18°C y, a continuación, se mantuvieron a 37°C durante 30 minutos para permitir el avance de las moléculas. Seguidamente, se trataron para ser analizadas mediante microscopía confocal.

### 3.2.9. Infección de las líneas oligodendrocíticas

Para infectar las líneas oligodendrocíticas, se utilizaron, o bien Falcon de 25 cm<sup>2</sup> con 2x10<sup>6</sup> células KG-1C y 4x10<sup>6</sup> células Vero –como control–, o bien placas de cultivo que contenían cubreobjetos redondos tapizados con las células. Según se indica en cada caso, se infectó a distintas m.d.i., dependiendo del objetivo a analizar. El procedimiento consistió en añadir a las células adheridas el volumen adecuado de medio adecuado y con la cantidad correspondiente de virus. Tras una hora de adsorción, se quitó el medio y se lavó con PBS, añadiendo a continuación MC o MD. Tras el tiempo correspondiente de infección, que se indica en cada caso, se desprendieron las células y se sonicó dos veces con sonda en baño de hielo durante 30 segundos, con un intervalo de un minuto entre ambas sonicaciones. Se centrifugó 10 minutos a 6.000 g y se congeló el sobrenadante a –70°C.

### 3.2.10. Titulación de virus

#### Titulación por dosis infecciosa 50 en cultivo de tejidos (TCID<sub>50</sub>)

Para titular por este método los stocks víricos obtenidos, se utilizaron placas de 96 pocillos tapizadas con 20.000 células Vero por pocillo en 100 µl de medio DMEM al 10% de SFB con antibióticos. Se hicieron diluciones seriadas en base 10 del virus obtenido –en medio DMEM al 10% de SFB– y se inocularon los pocillos por cuadruplicado con 50 µl de cada dilución, desde 10<sup>-2</sup> hasta 10<sup>-9</sup>, incubándose después a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% durante dos días; tras los cuales se observó al microscopio la aparición del ECP. En función de la presencia o ausencia de dicho ECP, se calculó la TCID<sub>50</sub> por el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938).

Para conservar y registrar las titulaciones, las células infectadas se fijaron a la placa con formaldehído al 4% durante un mínimo de 15 minutos y posteriormente se tiñeron con una solución de cristal violeta al 2% en paraformaldehído al 10% durante 10 minutos. Finalmente, las placas se lavaron con agua y se dejaron secar.

#### Titulación por unidades formadoras de placas (u.f.p.)

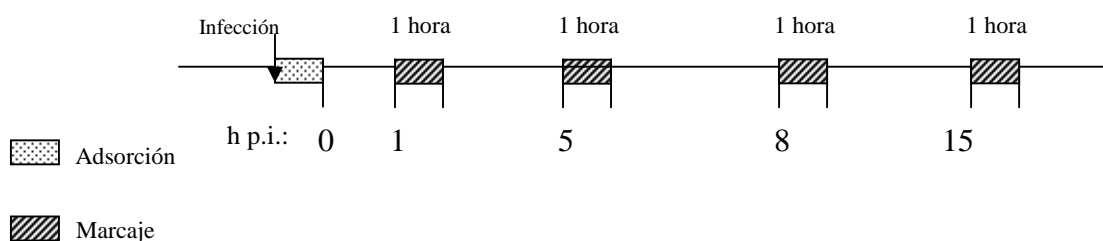
Para la titulación de los virus obtenidos por este procedimiento, se sembraron células Vero en placas de 6 pocillos con 400.000 células/pocillo en 2 ml de medio, dejando que crecieran hasta

estar subconfluentes. A continuación, se prepararon diluciones decimales del virus, con las que se inoculaba cada pocillo con un volumen de 0,4 ml. Durante la adsorción –una hora–, se preparaba una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8% en medio DMEM. Una vez transcurrido el tiempo de adsorción, se retiraba el medio de los pocillos, añadiendo 3 ml/pocillo de la disolución de agarosa atemperada  $-40^{\circ}\text{C}$ –, incubándose las placas durante tres días a  $37^{\circ}\text{C}$  en estufa al 5% de  $\text{CO}_2$ . Finalmente, las células se fijaron y se tiñeron según el método expuesto en el punto anterior, contándose el número de placas de lisis en cada pocillo. Considerando el número de placas y la dilución con la que se hubiera inoculado, se calculó el título en unidades formadoras de placas (u.f.p.) por ml.

### 3.2.11. Valoración de la síntesis de proteínas con $^{35}\text{S}$ -metionina

Para el estudio de la síntesis proteica, se utilizó un método radiactivo. Se incubó el cultivo infectado a distintos tiempos, más un control sin infectar, con metionina y cisteína marcadas con  $^{35}\text{S}$  y, tras la separación de los polipéptidos mediante SDS-PAGE, se visualizaron las proteínas individualmente en bandas mediante fluorografía y autorradiografía.

Para el marcaje metabólico, se comenzó sembrando placas de 24 pocillos con 100.000 células KG-1C por pocillo en 300  $\mu\text{l}$  de medio. Las células se infectaron con distintas m.d.i.: 0,1, 1 y 10. Tras una hora de adsorción se retiraba el virus no adsorbido. A los tiempos deseados, se procedía al marcaje con los aminoácidos marcados, tal como se representa en el siguiente esquema:



Antes de marcar los pocillos, se retiraba el medio y se lavaba dos veces con PBS. A continuación, se marcaban los pocillos con una concentración radiactiva de 50  $\mu\text{Ci/ml}$ , completándose cada pocillo hasta 100  $\mu\text{l}$  de medio DMEM sin metionina ni cisteína al 5% de SFB. Una vez transcurrida la hora de marcaje, se retiraba el medio radiactivo y lavaba dos veces con PBS. Finalmente, se añadían 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de solución de rotura (5% de Tris 1M pH 7;

10% de SDS al 10%; 12.5% de glicerol; 0.8% de azul de bromofenol y 5% de 2-Mercaptoetanol) y se conservaban congeladas las muestras.

### 3.2.12. Microscopía electrónica

#### Criosustitución

Para su observación al microscopio electrónico, se fijaron las células con PFA al 4% en tampón fosfato 0.2 M, pH 7.4. La fijación se inició mezclando volúmenes iguales de medio de cultivo con fijador 2X –8% PFA en tampón fosfato 0.4 M, pH 7.4–, manteniendo en esta mezcla las células durante 30 minutos. A continuación, se retiró la mezcla y se añadió, durante una hora, el fijador 1X. Seguidamente, se recogieron las células con raspador y se centrifugaron en microcentrífuga. El sedimento se resuspendió en tampón fosfato 0.1 M, a pH 7.4, y se centrifugó durante 10 minutos, repitiendo tres veces este proceso.

Para facilitar los cortes con ultramicrotomo y su posterior procesamiento, las células se embebieron en gelatina y se obtuvieron pequeños cubos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Estas piezas se crioprotegieron con sacarosa 2.3 M toda la noche a 4°C y se congelaron en propano líquido, pasando las muestras congeladas a metanol puro con 0.5 % de acetato de uranilo como colorante electrodens. La posterior deshidratación se llevó a cabo a -80°C durante 54 horas. La temperatura se elevó hasta -35°C para infiltrar la resina (Lowicryl K4M), produciéndose la polimerización bajo la luz UV. De estos bloques se obtuvieron cortes ultrafinos y se montaron en rejillas de níquel.

El inmunomarcaje se realizó de forma análoga a lo descrito en el apartado “inmunotransferencia”. Las rejillas se incubaron sucesivamente sobre gotas de solución de bloqueo –TBS con 5 % de BSA– durante 5 minutos a temperatura ambiente; primer anticuerpo en TBS con 1 % de BSA, durante una hora a temperatura ambiente y segundo anticuerpo acoplado a oro coloidal de 10 nm, durante 45 minutos. Tras el bloqueo con los anticuerpos se lavaba tres veces con TBS durante 10 minutos. Finalmente, los cortes se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un MET Jeo 11010 a 80Kv.

#### Criosecciones

Las células recién obtenidas del incubador se fijaron con fijador atemperado, formado por PFA

4% más glutaraldehído al 0.2% en tampón fosfato 0.1M a pH 7.4. Se añadió fijador 2X a un volumen igual de medio de cultivo y se dejó 30 minutos. A continuación se añadió fijador 1X y se dejó otros 90 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron tres veces con Glicina 20mM en PBS. Se añadió 1 ml de gelatina al 1% en PBS, se recogieron las células con espátula en esta solución y se centrifugaron 5 minutos en microcentrífuga a 5000 rpm. A continuación se resuspendieron en gelatina al 12%. Se dejaron a 37°C durante 20 minutos, tras lo cual se centrifugaron durante 5 minutos a 12000 rpm y se dejó solidificar la gelatina en hielo durante dos horas. Se prepararon bloques de 0.5mm<sup>3</sup>. Seguidamente, se crioprotegieron los bloques en sacarosa 2.3M a 4°C durante al menos 4 horas. Los bloques se montaron sobre portamuestras del crioultramicrotomo, se arrojaron a nitrógeno líquido y se almacenaron sumergidos en él. Se obtuvieron crio-secciones ultrafinas -70-80 nm grosor- a -120°C en ultramicrotomo Leica UCT equipado con criocámara Leica EM FCS. Los cortes se recogen con un *loop* en volúmenes iguales de metilcelulosa al 2% en agua y sacarosa 2.3M. Se recogieron en rejillas de Cu/Paladio hexagonales de 100 mesh y recubiertas con Formvar y carbón y se reservaron sobre gelatina al 2% en PBS en placas de 35 mm de diámetro, a 4°C hasta realizar el inmunomarcado.



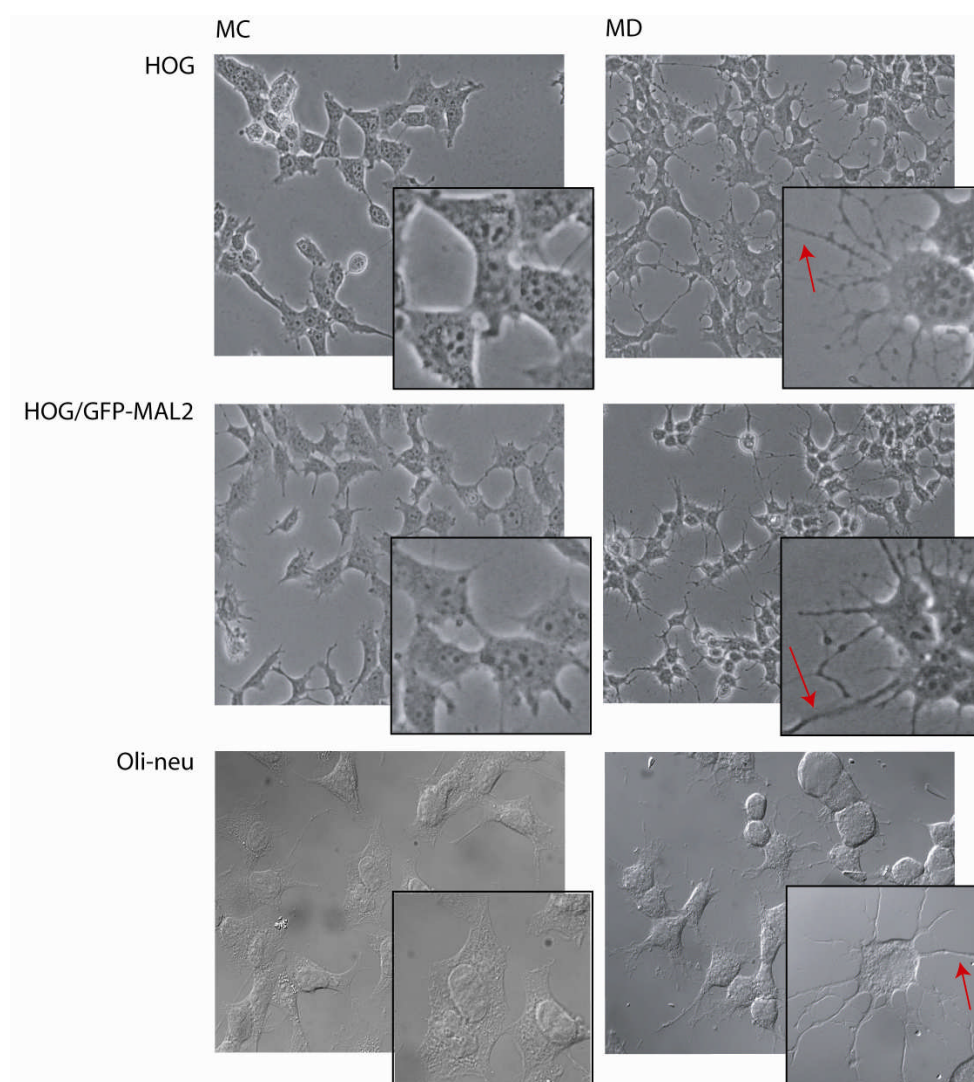
## RESULTADOS

---



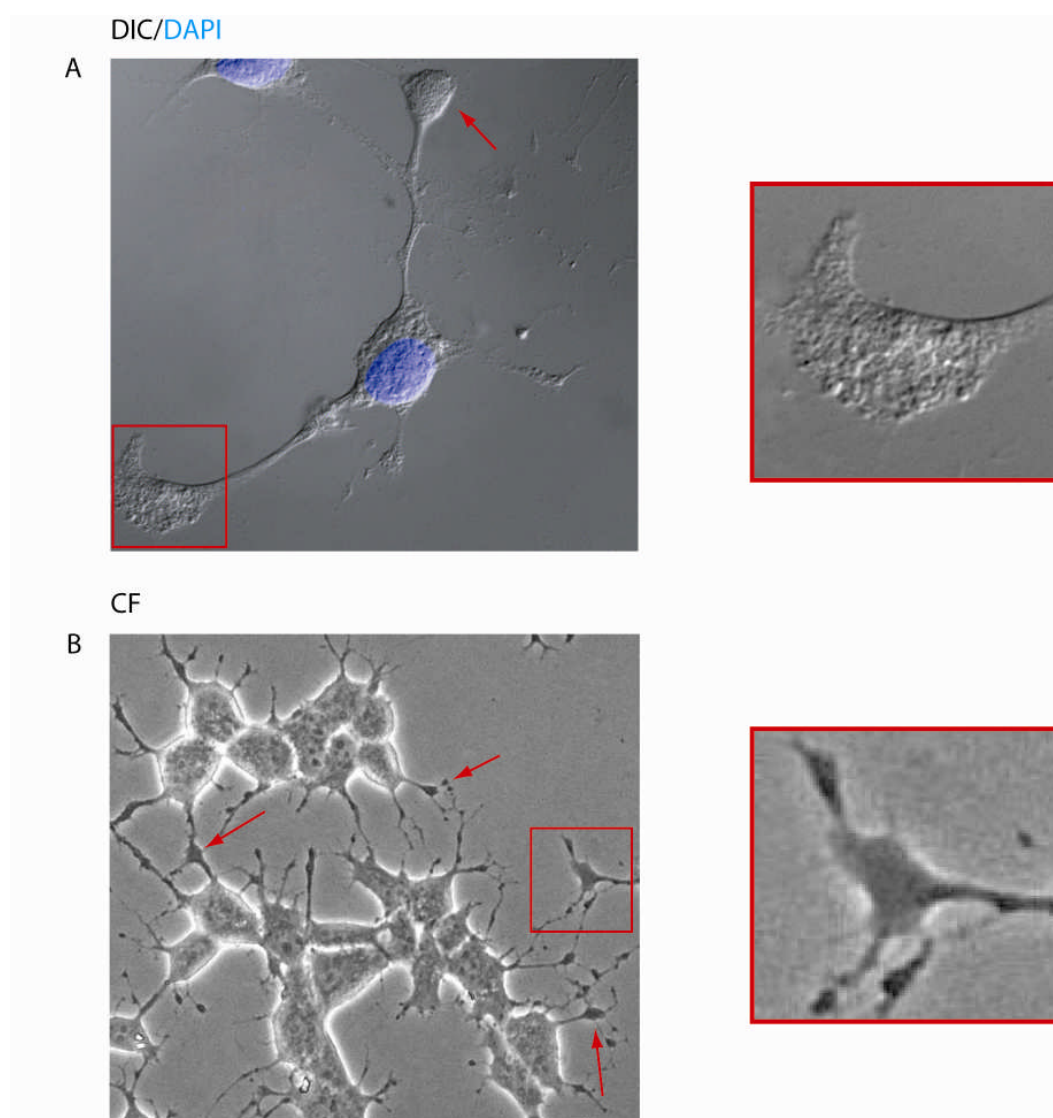
#### 4.1. Crecimiento y diferenciación de las líneas oligodendroclíticas

La línea precursora murina Oli-neu se cultivó en medio de crecimiento (MC) según se detalla en Materiales y Métodos. Para inducir la diferenciación, se utilizó medio de diferenciación (MD), que contenía db-cAMP (1 mM). En estas condiciones, las células ralentizaron su crecimiento y a las 48 horas de cultivo con MD ya mostraban una morfología caracterizada por el redondeo del soma celular –pericarion– y el desarrollo de prolongaciones citoplásmicas o procesos (Figura 15). La diferenciación de esta línea celular se prolonga hasta los 10-12 días de cultivo con MD. La misma morfología característica de un estado diferenciado adquiere la línea humana HOG cuando se cultiva con su equivalente MD suplementado con db-cAMP/IBMX (Figura 15).



**Figura 15. Cambios morfológicos en las células diferenciadas.** Las líneas celulares HOG, GFP-MAL2/HOG y Oli-neu fueron cultivadas en MC ó MD durante 4 días. En las células cultivadas en MD se observa el redondeamiento del pericarion y la aparición de procesos (flechas).

A diferencia de la línea murina, la línea humana empieza a mostrar un fenotipo diferenciado a las pocas horas de cultivarse en MD. Además, según muestra la **Figura 16**, imágenes de campo claro de células Oli-neu cultivadas durante 5 días en MD, y células HOG cultivadas durante 2 días en MD, mostraron, a lo largo de los procesos, unas estructuras semejantes a vainas de mielina (*myelin-like membrane sheets*), estructuras que han sido descritas en cultivos primarios de OLs y cultivos mixtos con neuronas.



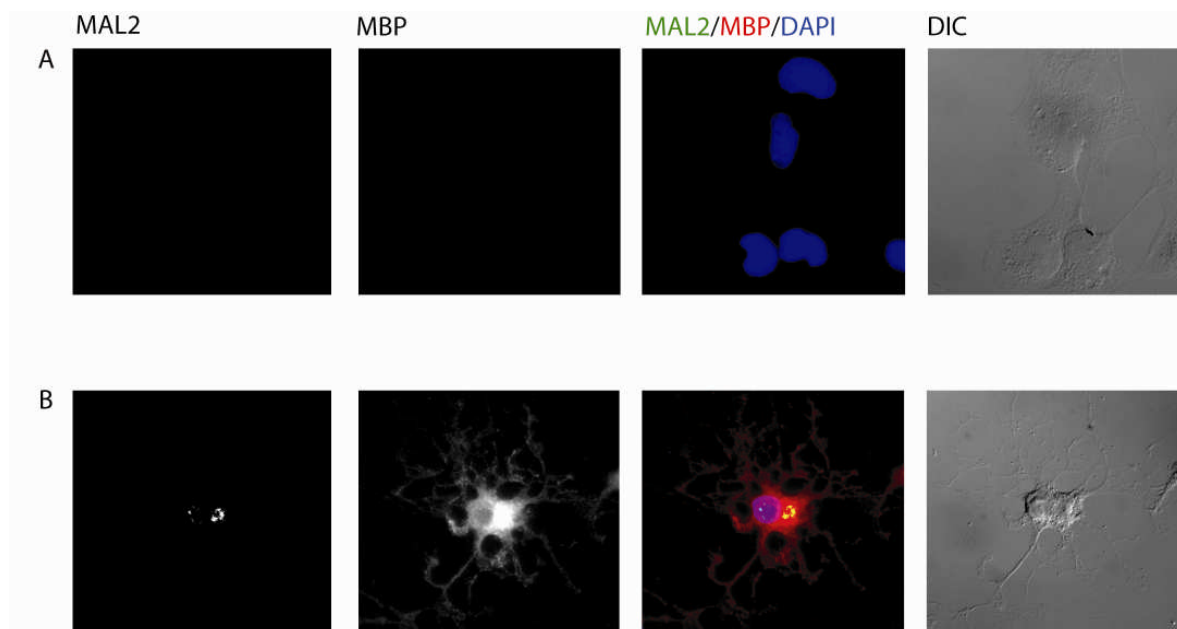
**Figura 16. Formación de láminas semejantes a mielina (*myelin-like sheets*) en células cultivadas en MD.** A. Imagen de campo claro (DIC, *Differential Interference Contrast*, contraste de interferencia diferencial o Nomarski) de células Oli-neu cultivadas durante 5 días en MD mostrando láminas semejantes a mielina (flecha). En azul se muestra el núcleo celular. B. Imagen de campo claro (CF, contraste de fases) de células HOG cultivadas durante 2 días en MD mostrando láminas semejantes a mielina (flechas).

La línea humana KG-1C se cultivó en el mismo MC que las otras dos líneas oligodendrocíticas. No obstante, cuando se procedió a cultivar las células en condiciones de diferenciación, no se encontró ningún medio que produjera cambios apreciables en los marcadores moleculares ni en la morfología de esta línea celular compatibles con un estado de desarrollo más avanzado.

## 4.2. Estudio de MAL2 en células Oli-neu

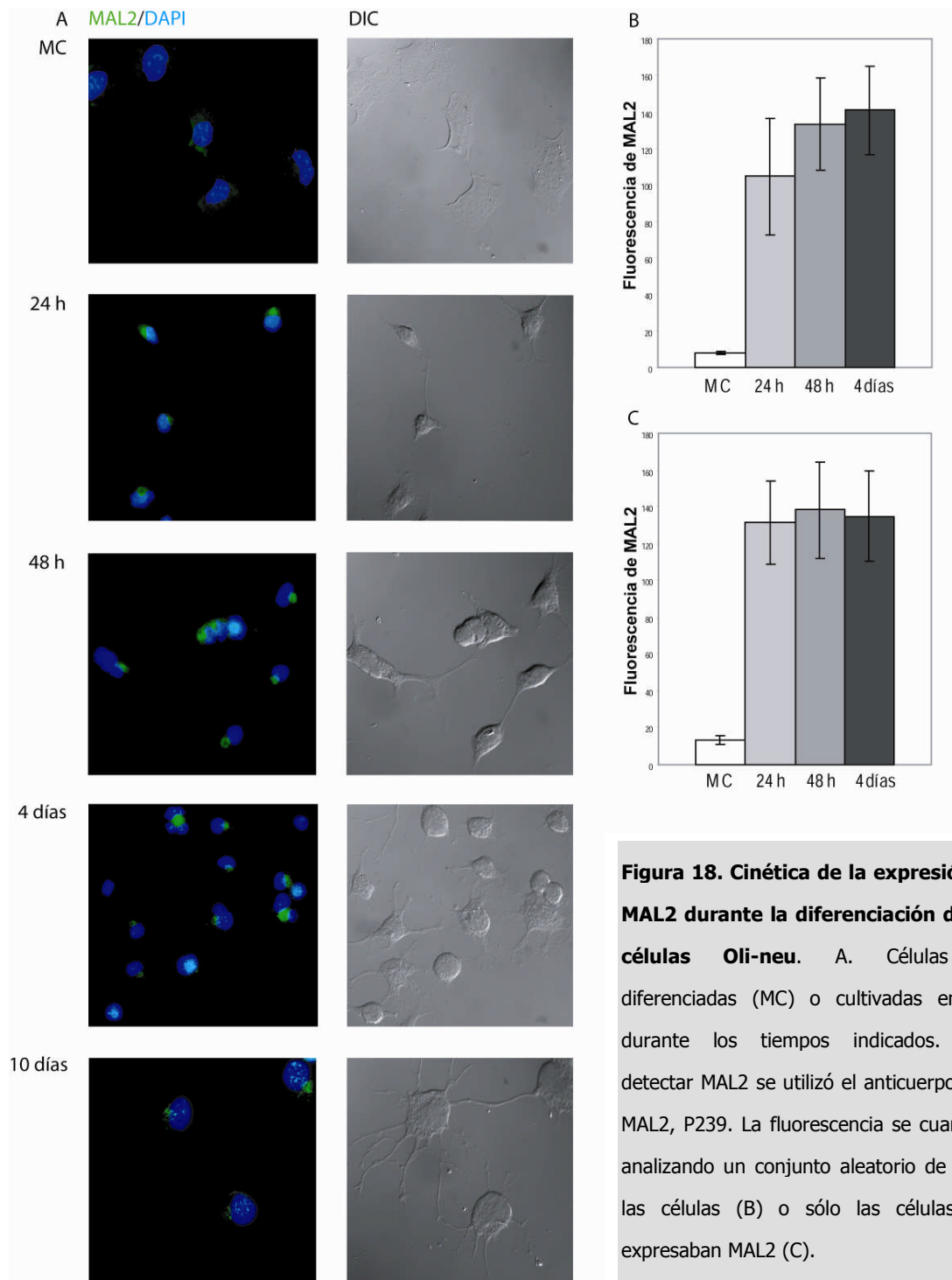
### 4.2.1. Expresión de MAL2 y asociación a *rafts* en células Oli-neu

Este trabajo ha mostrado por vez primera la expresión del proteolípido MAL2 en líneas celulares oligodendrocíticas. Esta expresión se detectó inicialmente en la línea humana KG-1C y, posteriormente, en la línea murina Oli-neu y en la humana HOG. El análisis de MAL2 en Oli-neu reveló que la expresión de esta proteína cambiaba con el estado de diferenciación. Para determinar estos cambios durante el proceso de diferenciación, se llevó a cabo una doble inmunofluorescencia con anticuerpos anti-MAL2 y marcadores de diferenciación. Para ello, se utilizó el anticuerpo P239 anti- MAL2 y un anticuerpo monoclonal anti-MBP, marcador de diferenciación en oligodendrocitos (**Figura 17**). Se observó un aumento de MAL2 paralelo al aumento de MBP.



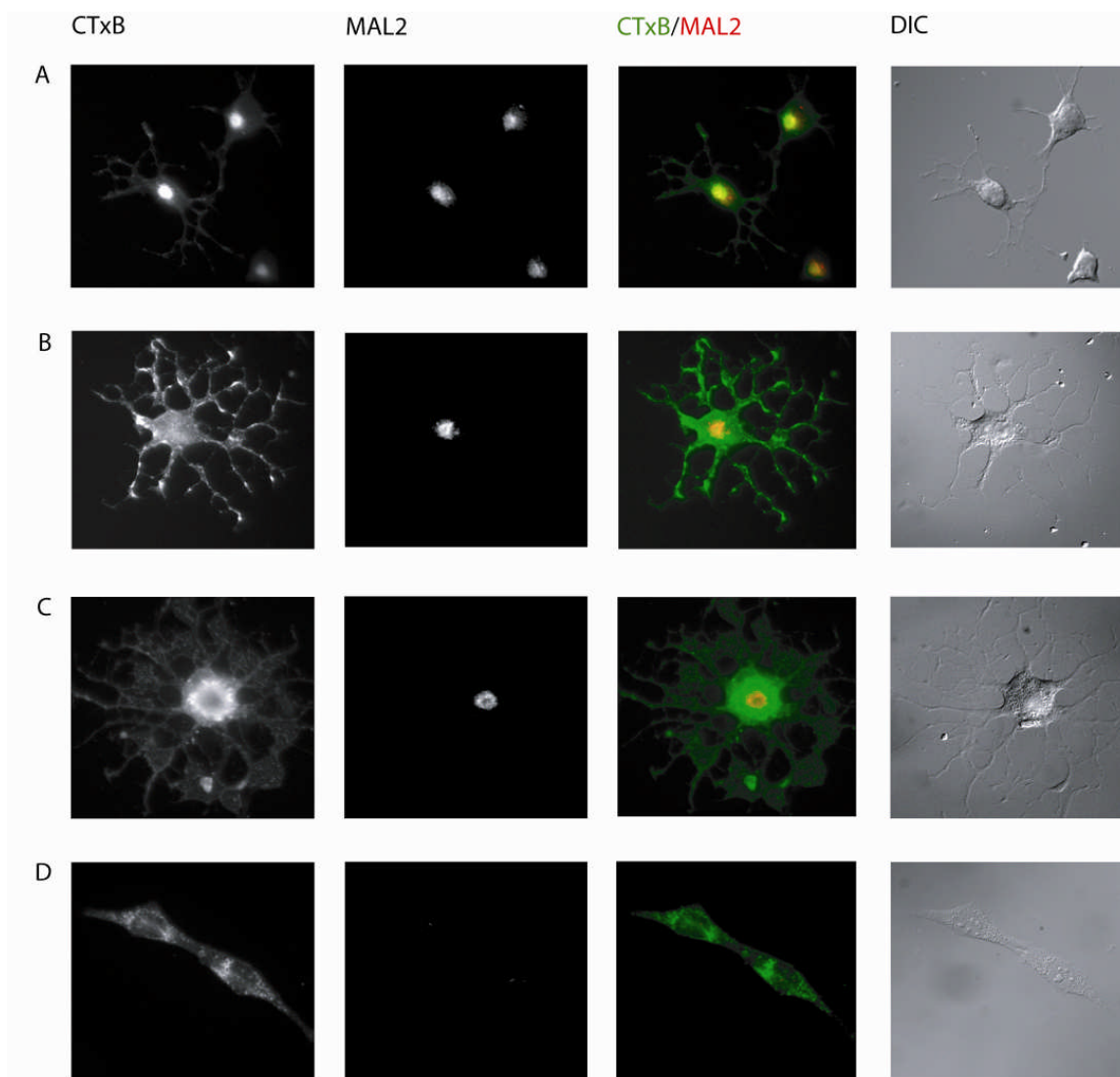
**Figura 17. Análisis de la expresión de MAL2 durante la diferenciación en células Oli-neu.** Las células se procesaron para su análisis mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-MAL2 P239 y anti-MBP. A. Células cultivadas en MC. B. Células cultivadas durante 10 días en MD. Se observa el aumento de la detección de MAL2 y de MBP en células diferenciadas.

La detección de MAL2 en la línea Oli-neu, aumentó a las pocas horas de someter las células a las condiciones de diferenciación. Veinticuatro horas después del cambio a MD, alrededor del 80% de las células expresaban niveles altos de MAL2 en comparación con las células cultivadas en MC, cuya expresión de MAL2 es muy baja o nula (**Figura 18**).



**Figura 18. Cinética de la expresión de MAL2 durante la diferenciación de las células Oli-neu.** A. Células no diferenciadas (MC) o cultivadas en MD durante los tiempos indicados. Para detectar MAL2 se utilizó el anticuerpo anti-MAL2, P239. La fluorescencia se cuantificó analizando un conjunto aleatorio de todas las células (B) o sólo las células que expresaban MAL2 (C).

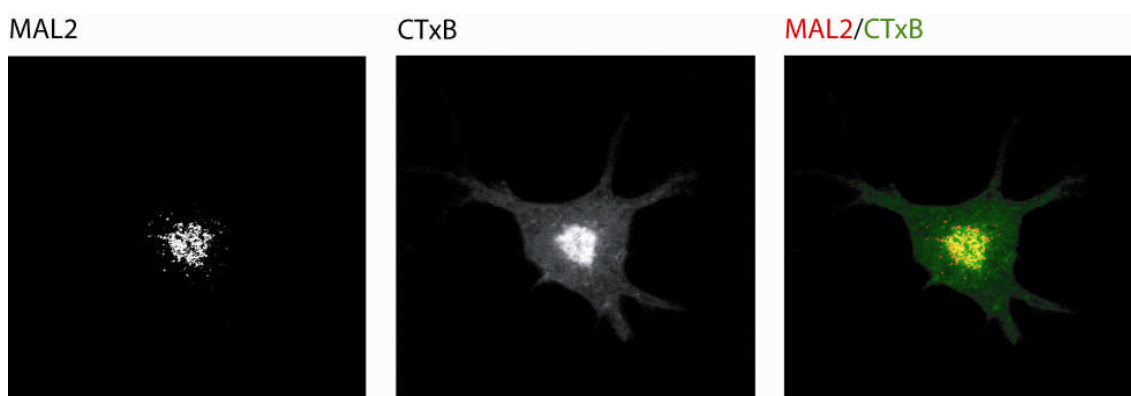
La localización de MAL2 en la línea hepática HepG2 parece estar asociada a *rafts*. La **Figura 19** muestra que en la línea Oli-neu, MAL2 colocaliza con la subunidad B de la toxina colérica (CTxB), un marcador de *rafts*, lo que sugiere también en nuestro sistema la localización de MAL2 en balsas lipídicas.



**Figura 19. Análisis de MAL2 y el marcador de *rafts* CTxB en células Oli-neu.** A. Células cultivadas en MD fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C (A) o bien a 4°C (B) con la subunidad B de la toxina colérica (CTxB) acoplada a FITC. A continuación, las células fueron fijadas, permeabilizadas, incubadas con el anticuerpo anti-MAL2 P239 y analizadas mediante microscopía de fluorescencia. A 37°C, CTxB-FITC se internaliza y colocaliza con MAL2 (A), mientras que a 4°C, el marcador se queda en la superficie celular y no colocaliza con dicha proteína (B). En C y D, el marcaje se realizó fijando previamente las células en PFA al 4% durante 20 minutos. De esta manera, el marcador tampoco se internaliza y no se observa colocalización. C: células diferenciadas. D: células sin diferenciar.



Para llevar a cabo este ensayo, las células Oli-neu se cultivaron durante 3 días en MD en presencia de dbcAMP 1mM y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con la subunidad B de la toxina colérica acoplada a FITC (FITC-CTxB), para permitir la internalización de esta última. A continuación, las células se lavaron, se fijaron e incubaron con el anticuerpo anti-MAL2 P239. También se realizó la incubación a 4°C –temperatura que no permitiría la entrada de la toxina– para diferenciar las distintas localizaciones de CTxB. Asimismo, se realizó la incubación con CTxB en células previamente fijadas. La **Figura 19** muestra mediante microscopía convencional las distintas localizaciones de MAL2 y CTxB según el método de incubación usado. Se observa que ambas proteínas colocalizan a 37°C. Dicha colocalización se verificó mediante microscopía confocal (**Figura 20**).

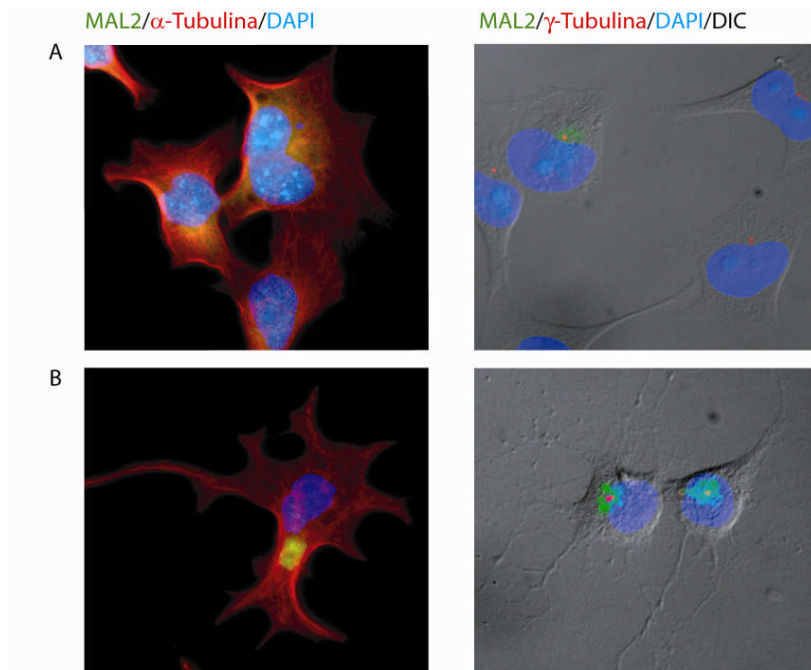


**Figura 20. Análisis confocal de MAL2 y CTxB en células Oli-neu.** Células cultivadas en MD fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C con CTxB-FITC. A continuación, las células fueron fijadas, permeabilizadas, incubadas con el anticuerpo anti-MAL2 P239 y analizadas mediante microscopía confocal. Las imágenes corresponden a un corte de 0.8  $\mu$ m.

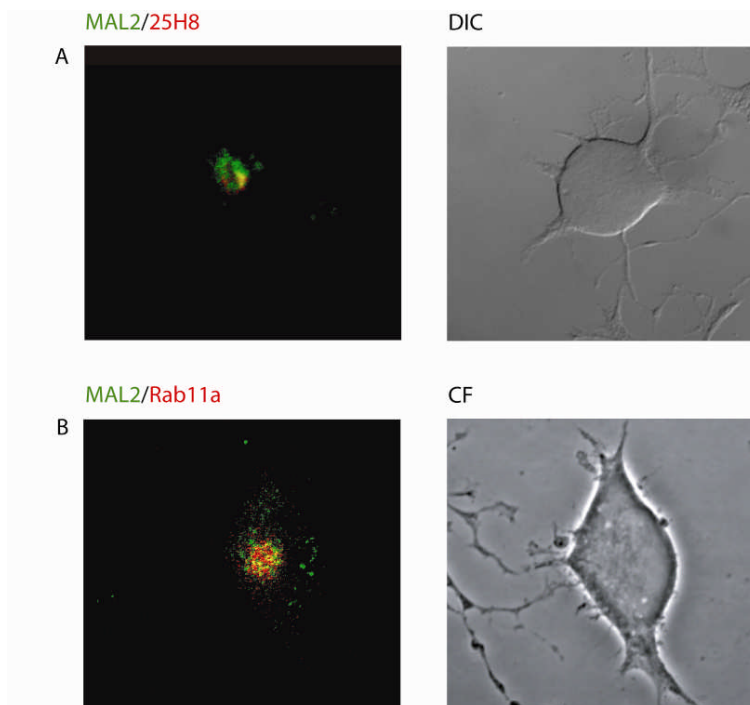
#### 4.2.2. Caracterización del compartimento positivo para MAL2 en células Oli-neu

Para investigar si el compartimento positivo para MAL2 (en adelante CPM2) compartía características comunes con las que encontradas en otras líneas epiteliales como los hepatocitos HepG2 y las células MDCK, se analizaron algunas de las características que definen al ARE/SAC. La **Figura 21** muestra que MAL2 se localiza en una región que rodea al centrosoma. Por otra parte, no se observa colocalización con el marcador de *cis*-Golgi 25H8, aunque ambos están próximos (**Figura 22A**). Mediante microscopía confocal, se observó también colocalización parcial de MAL2 con Rab11a, un marcador de ARE/SAC (**Figura 22B**).



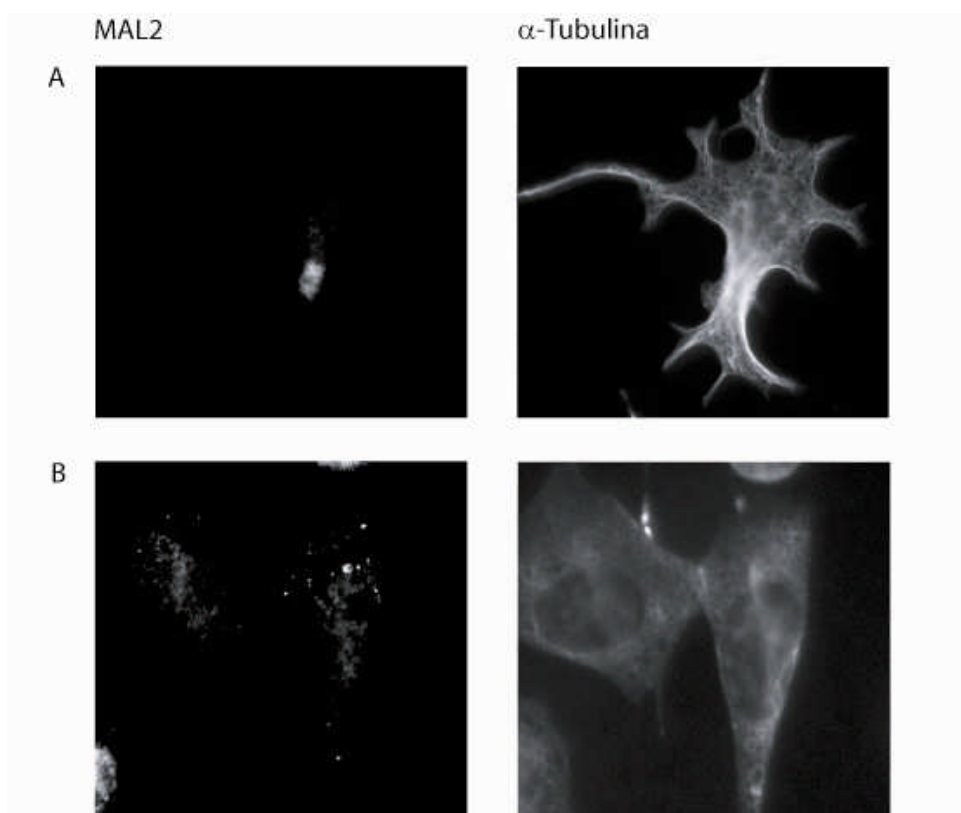


**Figura 21. Localización subcelular de MAL2 en células Oli-neu.** Doble inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-MAL2 P239, y los anticuerpos anti- $\alpha$ -Tubulina y anti- $\gamma$ -Tubulina. A. Células sin diferenciar. B. Células diferenciadas. Se aprecia la distribución pericentrosomal de MAL2.



**Figura 22. Caracterización del compartimento positivo para MAL2 en células Oli-neu diferenciadas.** A. Doble inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-MAL2 P239 y el marcador de *cis*-Golgi 25H8. Se muestra la imagen de campo claro correspondiente. B. Doble inmunofluorescencia confocal con el anticuerpo anti-MAL2 P239 y el anticuerpo anti-Rab11a. Las imágenes corresponden a un corte de 0.8  $\mu$ m. Se muestra también la imagen de campo claro.

Para determinar la sensibilidad del CPM2 a la desorganización del citoesqueleto de tubulina, se analizó el efecto del nocodazol –una droga que interfiere con la polimerización de los microtúbulos– sobre su integridad. La **Figura 23** muestra que, en células sin tratar –con el citoesqueleto íntegro según muestra el marcaje realizado con un anticuerpo anti- $\alpha$ -Tubulina–, MAL2 muestra una distribución pericentrosomal. Por el contrario, en las células tratadas con nocodazol, MAL2 pierde su distribución pericentrosomal y aparece disperso por el citoplasma.

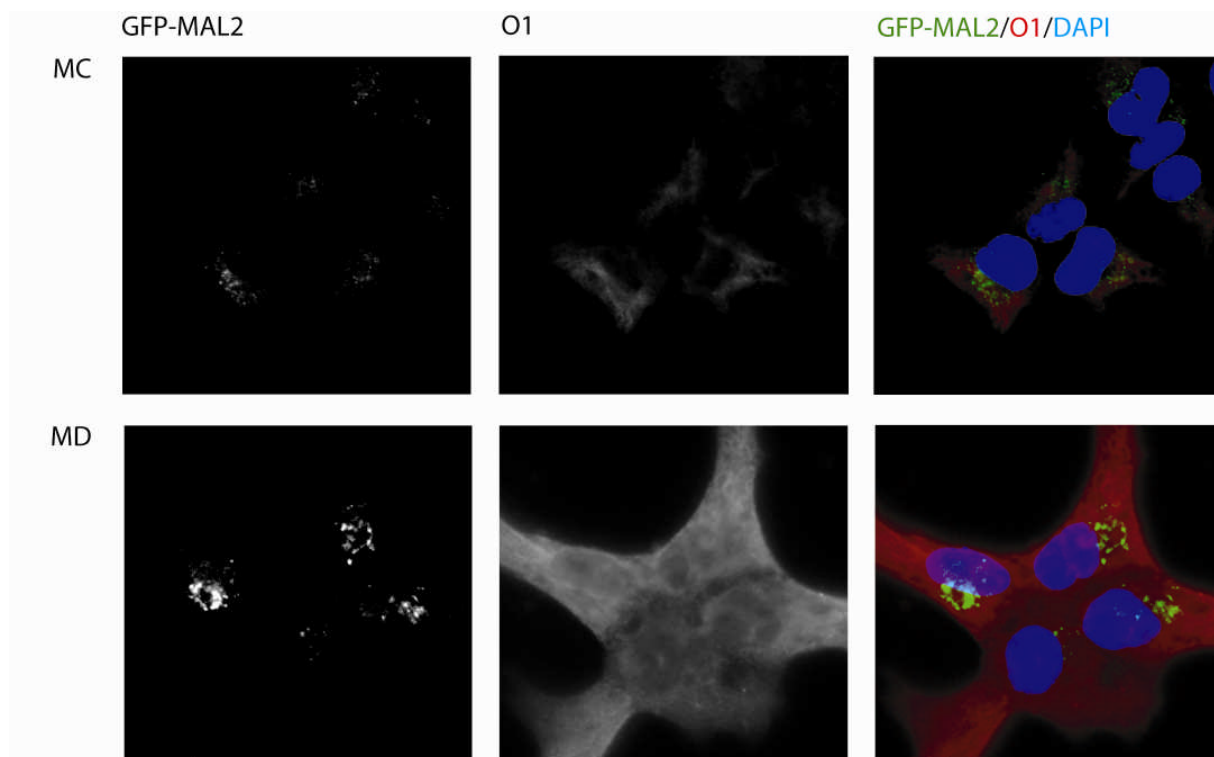


**Figura 23. Sensibilidad del compartimento positivo para MAL2 a la disgregación de microtúbulos en células Oli-neu.** Las células cultivadas en MC fueron incubadas durante una hora en ausencia (A) o presencia (B) de nocodazol 33  $\mu$ M a 37°C. A. En células sin tratar, MAL2 muestra una distribución pericentrosomal según se observa con el anticuerpo anti- $\alpha$ -Tubulina. B. El tratamiento con nocodazol provoca la dispersión de MAL2 por la célula.

#### 4.3. Estudio de MAL2 en células oligodendroclíticas humanas

La expresión de MAL2 en la línea celular oligodendroclítica humana HOG mostró características similares a las halladas en la línea Oli-neu. Al igual que en esta última, la proteína MAL2 endógena se detecta tempranamente a lo largo del proceso de diferenciación de HOG. Más del 50% de las células cultivadas en MD durante 48 horas expresaban MAL2, pero,

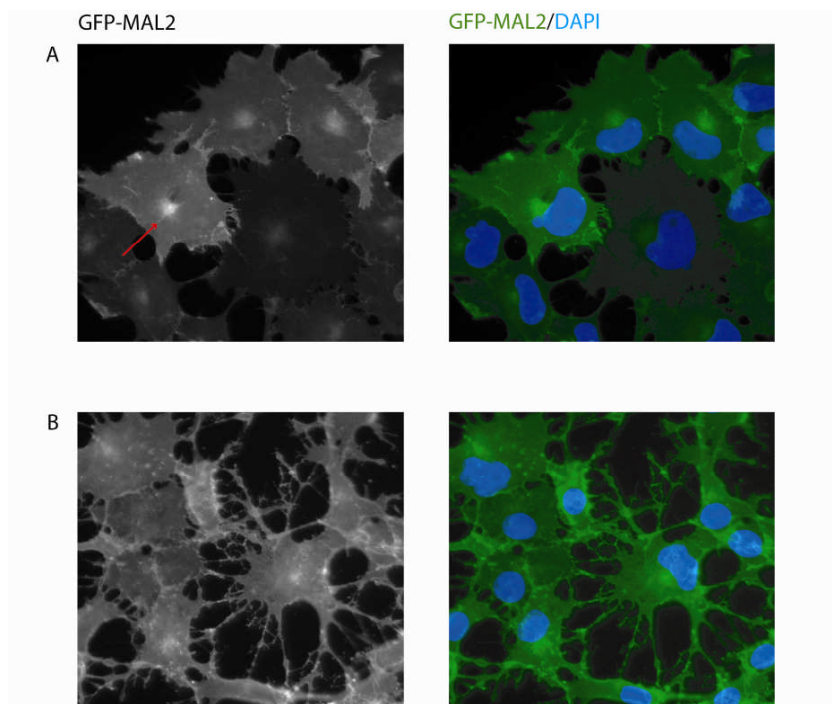
a diferencia de la línea murina, un pequeño porcentaje de células cultivadas en MC mostraba también una ligera expresión basal de dicha proteína (**Figura 24**).



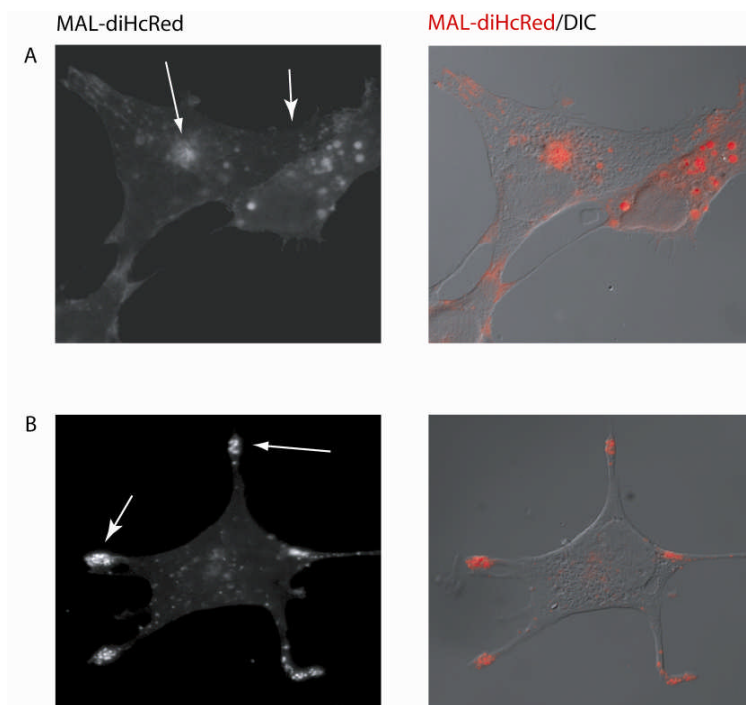
**Figura 24. Análisis de MAL2 durante la diferenciación en células HOG.** A. Las células cultivadas en MC y MD se procesaron para su análisis mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-MAL2 P239 y anti-O1. Se observa el aumento de MAL2 en células diferenciadas. Los núcleos celulares se detectaron con DAPI.

#### 4.3.1. Transfección estable de líneas oligodendrocíticas

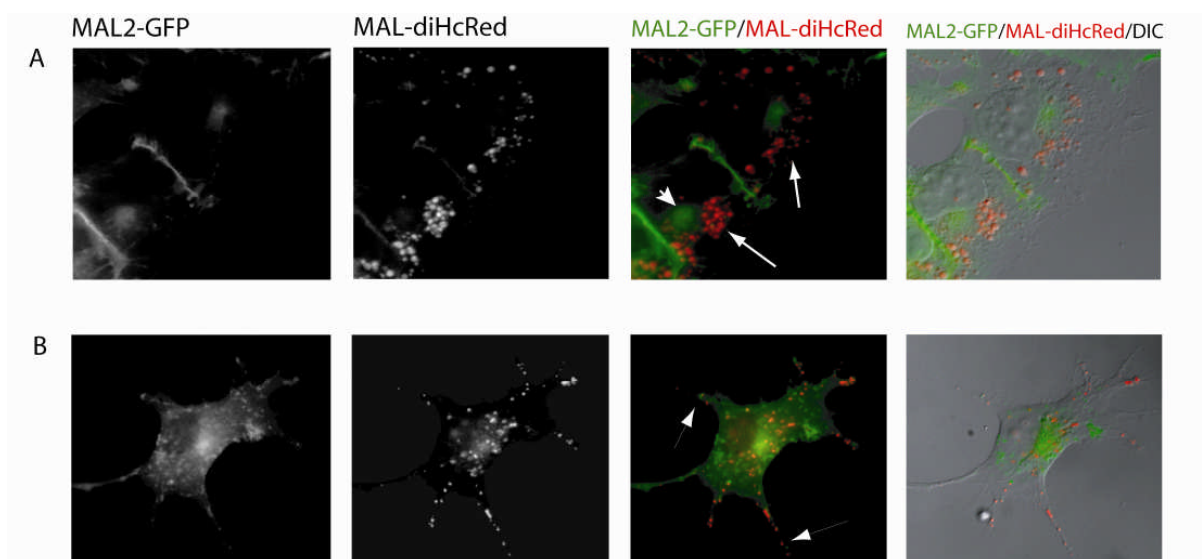
Un inconveniente en el estudio de MAL2 fue el bajo nivel de expresión de esta proteína. Para mejorar la detección y posibilitar diversos experimentos –como triples marcajes o microscopía *in vivo*–, se utilizó una construcción formada por la proteína verde fluorescente (GFP) unida al extremo amino-terminal de MAL2 (GFP-MAL2). La línea HOG se transfectó establemente con GFP-MAL2. Además, se realizó la transfección estable de la línea HOG con MAL-diHcRed. Se seleccionaron los clones que expresaban establemente GFP-MAL2 (**Figura 25**), MAL-diHcRed (**Figura 26**) y ambas construcciones (**Figura 27**).



**Figura 25. Transfección de la línea HOG con GFP-MAL2.** A. Células cultivadas en MC. MAL2 exógeno se distribuye mayoritariamente en la zona pericentrosomal (flecha). B. Células cultivadas en MD. Se observa el aumento de MAL2 exógeno.



**Figura 26. Transfección de la línea HOG con MAL-diHcRed.** A. Células cultivadas en MC. MAL exógeno se distribuye mayoritariamente en vesículas localizadas en la zona Golgi/TGN (flecha). B. Células cultivadas en MD. Se observa la acumulación de MAL exógeno en los extremos de los procesos (flechas).

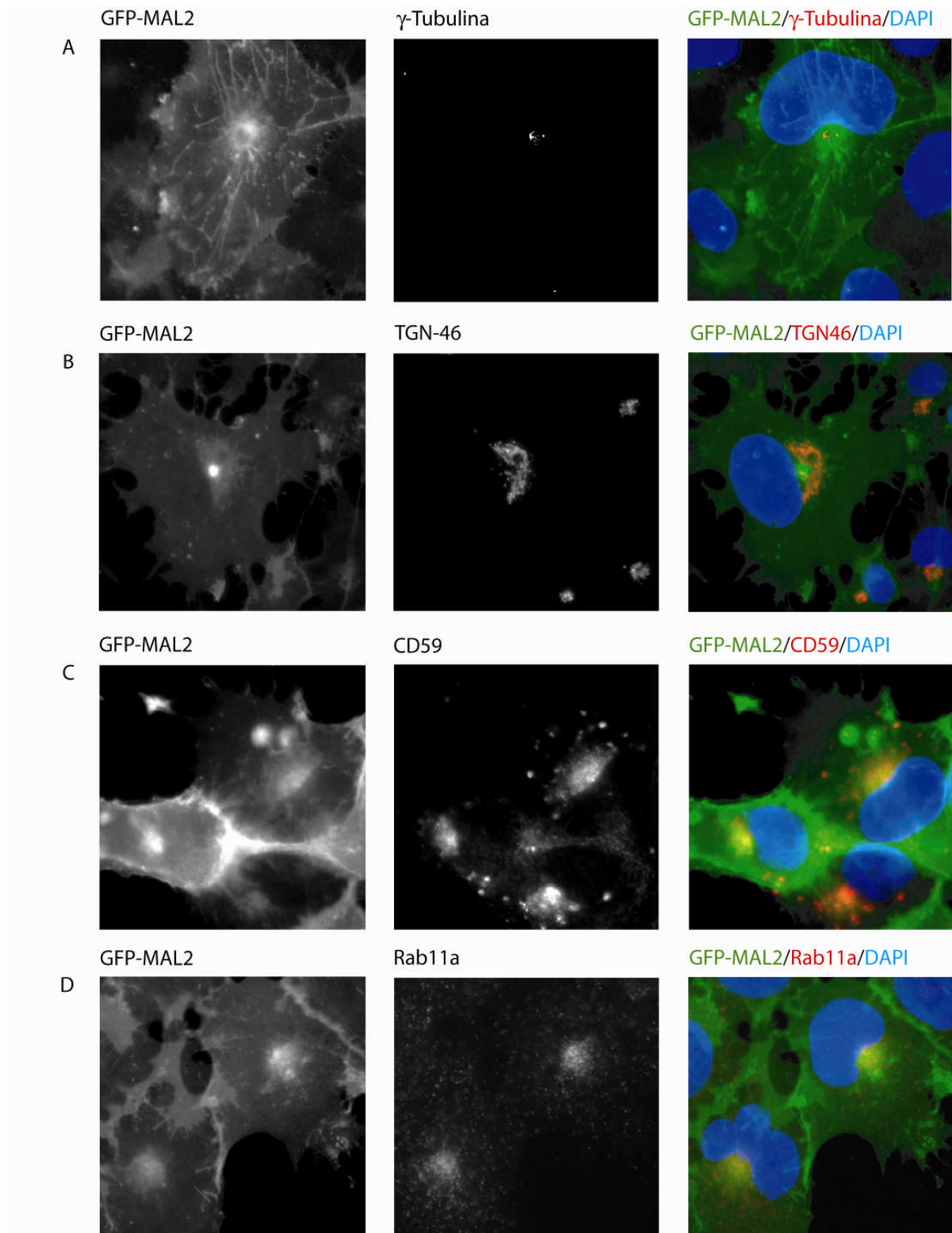


**Figura 27. Transfección de la línea HOG con GFP-MAL2 Y MAL-diHcRed.** A. Células cultivadas en MC. MAL exógeno se distribuye mayoritariamente en vesículas localizadas en la zona Golgi/TGN (flechas), mientras que MAL2-GFP es principalmente pericentrosomal (cabeza de flecha). B. Células cultivadas en MD. Se observa el aumento de GFP-MAL2 y la redistribución de MAL exógeno hacia los extremos de los procesos (flechas).

En las células Oli-neu transfectadas, la proteína MAL2 exógena mostró el mismo patrón de localización pericentrosomal que la endógena. Además, en las células transfectadas, GFP-MAL2 se encontró también en vesículas situadas a lo largo de los procesos (dato no mostrado).

#### 4.3.2. Caracterización del CPM2 en HOG

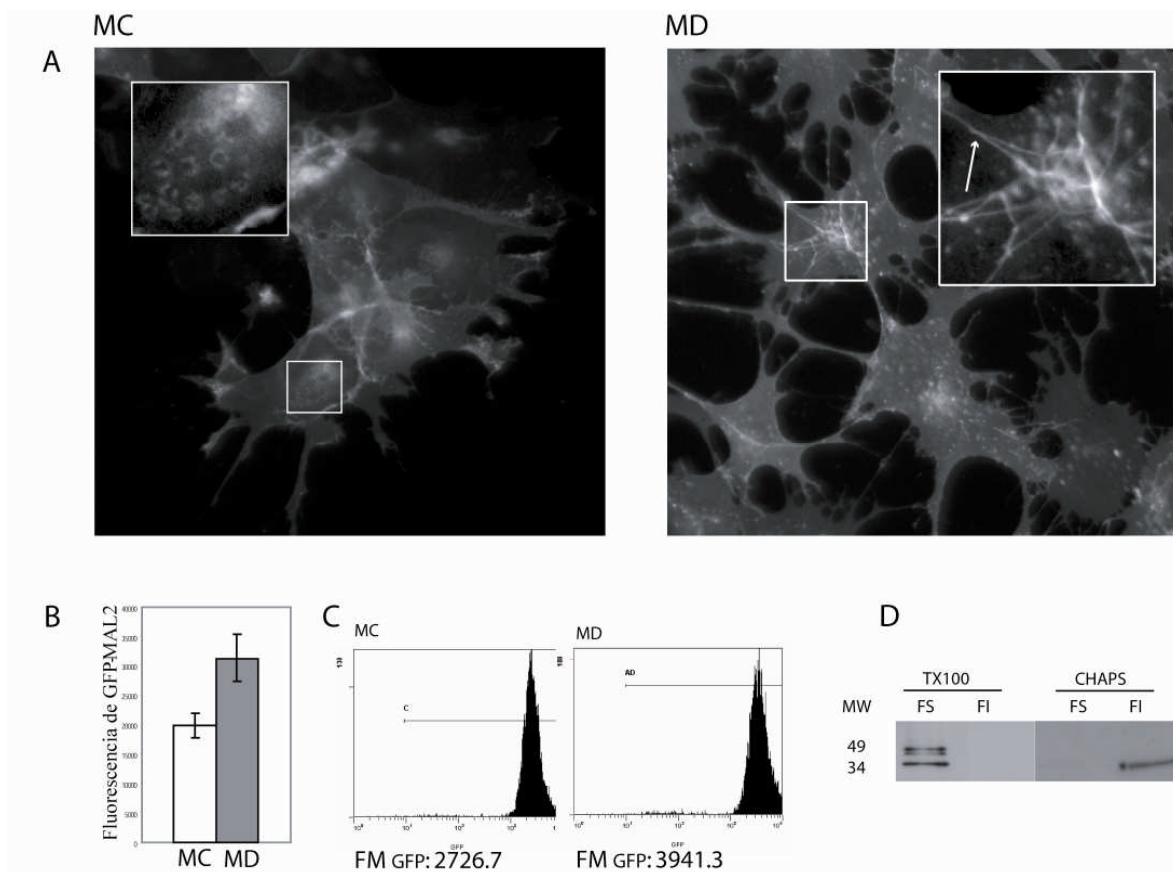
Para mejorar la detección de MAL2 y posibilitar distintos abordajes futuros en su estudio, se decidió utilizar como modelo la línea HOG transfectada con GFP-MAL2. Las características del CPM2 en células HOG transfectadas fueron similares a las observadas con la proteína MAL2 endógena de la línea Oli-neu. La **Figura 28** muestra la distribución pericentrosomal de GFP-MAL2 (**Figura 28A**) y la posible colocalización, al menos parcial, con CD59 y Rab11a (**Figura 28C y D**). Asimismo, se encontraron vesículas positivas para CD59 pero no para GFP-MAL2. Por otro lado, la colocalización de GFP-MAL2 y Rab11a se observó sólo en la fracción GFP-MAL2 pericentrosomal, no en las estructuras vesiculares y tubulovesiculares dispersas por el citoplasma. En relación con el aparato de Golgi, se analizó por inmunofluorescencia la distribución de GFP-MAL2 y del marcador de la red *trans*-Golgi (TGN) TGN46, sin que se observara colocalización (**Figura 28B**). Tampoco se apreció colocalización con el marcador del Golgi medio manosidasa II –dato no mostrado–.



**Figura 28. Localización subcelular de GFP-MAL2 en células HOG.** Las células GFP-MAL2/HOG fueron cultivadas en MC y procesadas para ser analizadas mediante microscopía de fluorescencia con anticuerpos contra  $\gamma$ -Tubulina (A), TGN46 (B), CD59 (C) y Rab11a (D). Se aprecia la distribución peri-centrosomal de GFP-MAL2 (A) y la posible colocalización, al menos parcial, con CD59 y Rab11a (C y D).



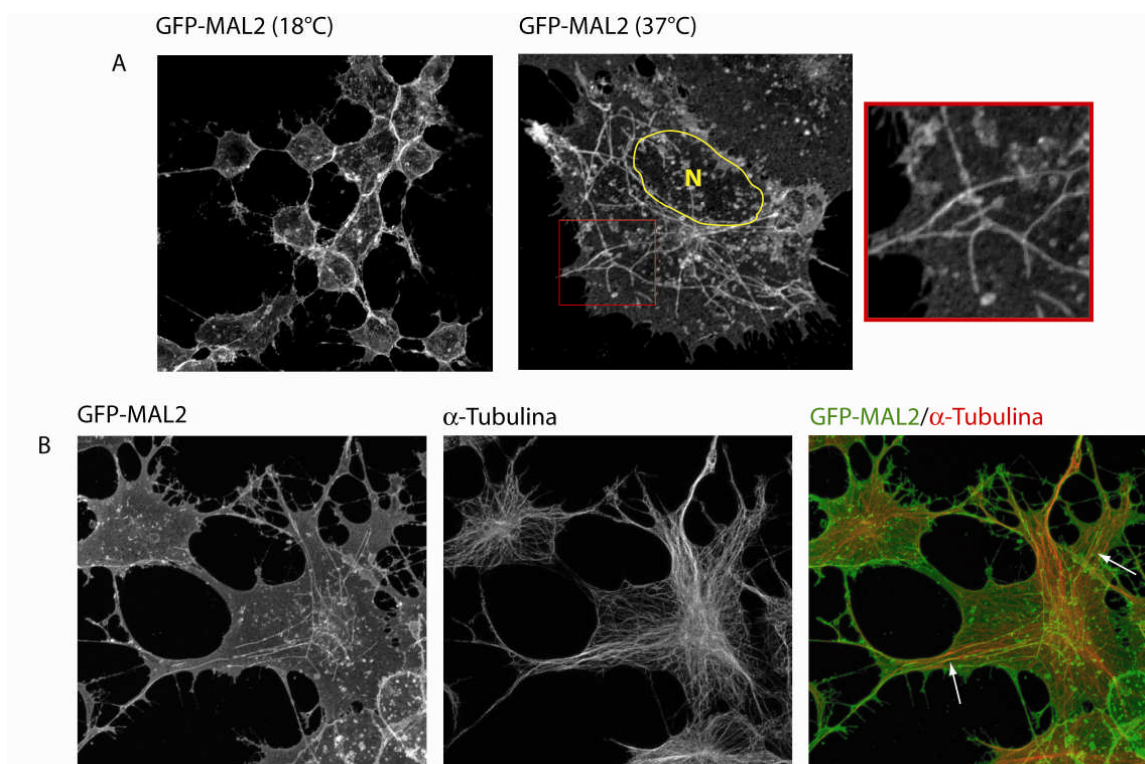
Las células GFP-MAL2/HOG se cultivaron en MC y MD y nuevamente se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. En cultivos con MD, la expresión de la proteína MAL2 exógena siguió siendo pericentrosomal, pero la cantidad de estructuras tubulovesiculares positivas para GFP-MAL2 aumentó en comparación con las células cultivadas en MC (**Figura 29A**). Además, la cuantificación de la fluorescencia mostró un aumento de GFP-MAL2 en las células diferenciadas (**Figura 29B**). El aumento fue de 1,6 veces respecto a las células cultivadas en MC. Además, los ensayos de citometría de flujo corroboraron estos resultados, mostrando un aumento en la fluorescencia media de GFP-MAL2 en células cultivadas en MD de 1,4 veces respecto a las células cultivadas en MC (**Figura 29C**).



**Figura 29. Expresión de GFP-MAL2 y asociación a rafts en las células HOG.** A. Las células se cultivaron en MC ó MD y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. En cultivos con MC, la localización de GFP-MAL2 es principalmente pericentrosomal, aunque también se ven agrupamientos tubulovesiculares en el citoplasma (cuadro). En células cultivadas en MD, la cantidad de tubulovesículas es mayor y, en algunas células, se ve un retículo tubular (cuadro) orientado hacia los procesos (flecha). B. Cuantificación de la fluorescencia de GFP-MAL2. C. Análisis de GFP-MAL2 mediante citometría de flujo. D. Asociación a rafts. Las células se trataron con Triton X-100 o CHAPS y se centrifugaron en gradientes de sacarosa. Alícuotas de las fracciones soluble (FS) e insoluble (FI) fueron sometidas a SDS-PAGE y analizadas mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-GFP.

Para confirmar la localización de MAL2 exógeno en *rafts* en la línea humana HOG, se trataron las células GFP-MAL2/HOG con 1% Triton X-100 o con CHAPS a 4°C, y se centrifugaron en gradientes de sacarosa según se explica en Materiales y Métodos. Alícuotas de las fracciones soluble (FS) e insoluble (FI) fueron sometidas a SDS-PAGE y analizadas mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-GFP. GFP-MAL2 fue encontrado en la FI de las células tratadas con CHAPS, indicando la presencia de MAL2 exógeno en balsas lipídicas (**Figura 29D**).

En algunas células se observó además un retículo tubular positivo para GFP-MAL2 (**Figura 29A**). En experimentos posteriores, observamos que ese retículo no se detectaba en las células cultivadas a 18°C pero cuando se elevaba la temperatura a 37°C esta estructura aparecía otra vez. Para confirmar esta observación, incubamos células diferenciadas a 18 o a 37°C durante 90 minutos. A continuación, se procesaron para su análisis mediante microscopía confocal, confirmándose que el retículo tubular positivo para GFP-MAL2 aparecía sólo en las células cultivadas a 37°C (**Figura 30A**). Esto sugiere que dicha estructura puede estar relacionada con las etapas finales del tránsito de MAL2 desde el CPM2 hasta la superficie apical.



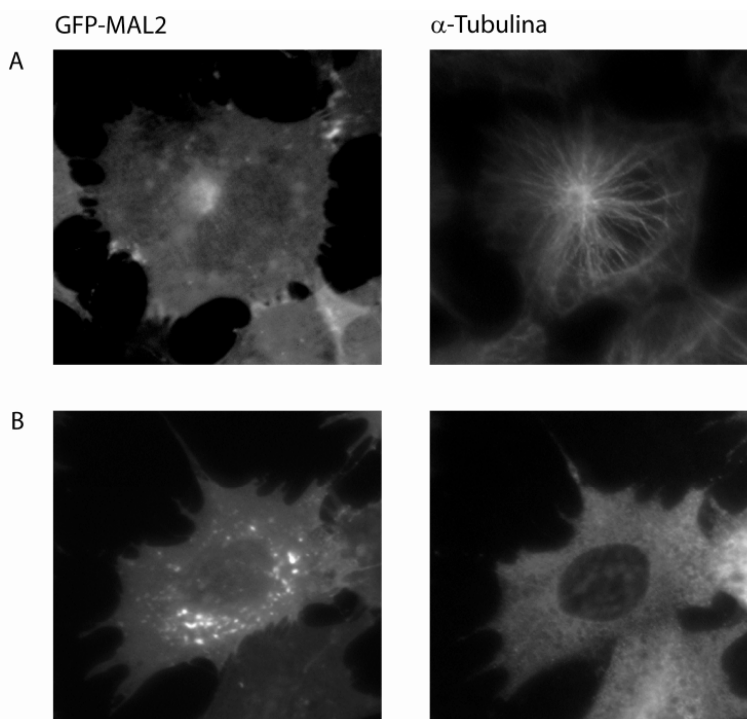
**Figura 30. Localización del retículo tubular en células GFP-MAL2/HOG.** A. Las células cultivadas en MD se incubaron durante 90 minutos a 18 o a 37°C. Después, se fijaron y se procesaron para su análisis mediante microscopía confocal. Las imágenes corresponden a la proyección de los cortes confocales. El retículo tubular aparece sólo en las células cultivadas a 37°C. (N, núcleo). B. Las células cultivadas en MD se fijaron y se procesaron para su análisis mediante microscopía confocal con un anticuerpo anti- $\alpha$ -Tubulina. Las imágenes



corresponden a la proyección de los cortes confocales. Aunque el retículo tubular sigue una localización paralela a los microtúbulos en algunas zonas (flechas), no se observa colocalización clara entre ambas estructuras.

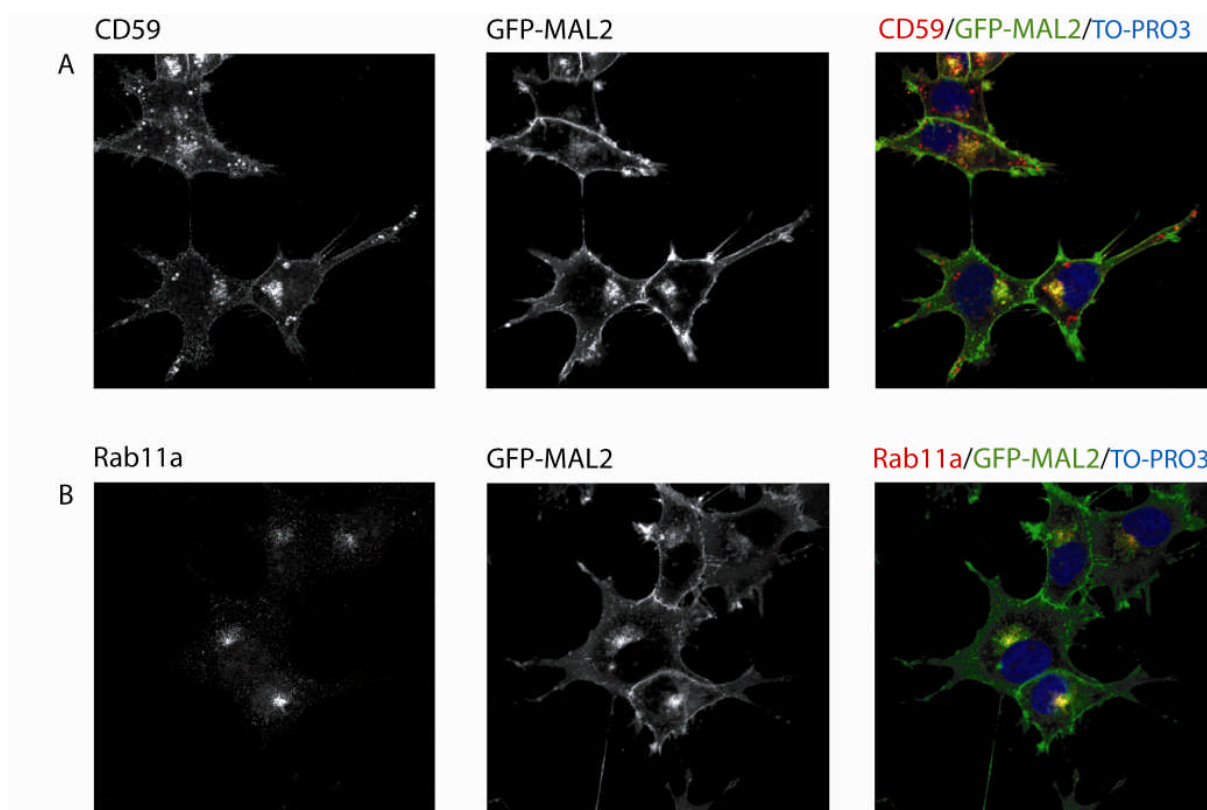
Dado que se apreció una distribución de este retículo paralela a los microtúbulos, las células cultivadas en MD se fijaron y se procesaron para su análisis mediante microscopía confocal con un anticuerpo anti- $\alpha$ -Tubulina. Aunque el retículo tubular sigue una localización paralela a los microtúbulos en algunas zonas, no se observó colocalización clara entre ambas estructuras (**Figura 30B**).

La distribución del CPM2 en relación con la red de microtúbulos se estudió induciendo la desintegración del citoesqueleto de tubulina con nocodazol. Mientras que GFP-MAL2 mostró una distribución pericentrosomal en células sin tratar, según se observa con el anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina, el tratamiento con nocodazol produjo la dispersión de GFP-MAL2 por la célula (**Figura 31**).



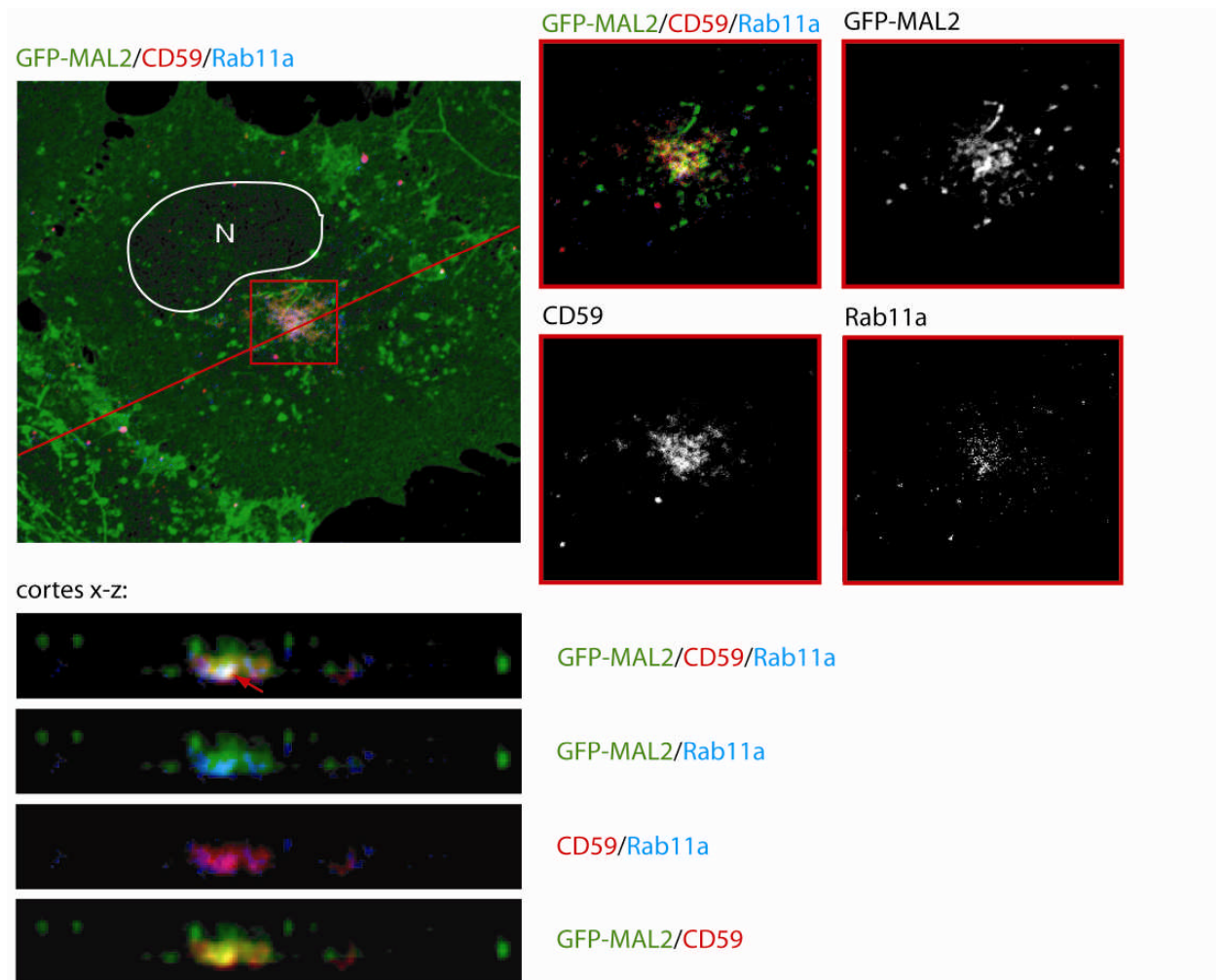
**Figura 31. Sensibilidad del compartimento positivo para GFP-MAL2 a la desintegración de microtúbulos en células HOG.** Las células cultivadas en MC fueron incubadas durante una hora en ausencia (A) o presencia (B) de nocodazol, 33  $\mu$ M a 37°C. A. En células sin tratar, GFP-MAL2 muestra una distribución pericentrosomal según se observa con el anticuerpo anti- $\alpha$ -Tubulina. B. El tratamiento con nocodazol provoca la dispersión de GFP-MAL2 por la célula.

La posible asociación espacial de GFP-MAL2 con CD59 y Rab11a se corroboró mediante microscopía confocal, la cual mostró la colocalización de la molécula transcitótica CD59 en el CPM2 (**Figura 32A**). También se confirmó la colocalización de GFP-MAL2 y Rab11a, un marcador de ARE/SAC (**Figura 32B**).



**Figura 32. Análisis confocal de CD59 y Rab11a en células GFP-MAL2/HOG.** Las células cultivadas en MC fueron fijadas y procesadas para ser analizadas mediante microscopía confocal. A. Cortes confocales de 1  $\mu$ m muestran la colocalización de GFP-MAL2 y CD59 en una estructura pericentrosomal. También se encuentran dispersas por el citoplasma vesículas positivas para CD59 pero no para GFP-MAL2. B. Cortes confocales de 1  $\mu$ m muestran la colocalización de GFP-MAL2 y Rab11a en una estructura pericentrosomal.

A continuación, se procedió al análisis simultáneo de GFP-MAL2, Rab11a y CD59 mediante microscopía de fluorescencia confocal. Los resultados mostraron la colocalización de las tres proteínas mencionadas en el mismo compartimento, que presentaba una localización pericentrosomal (**Figura 33**).

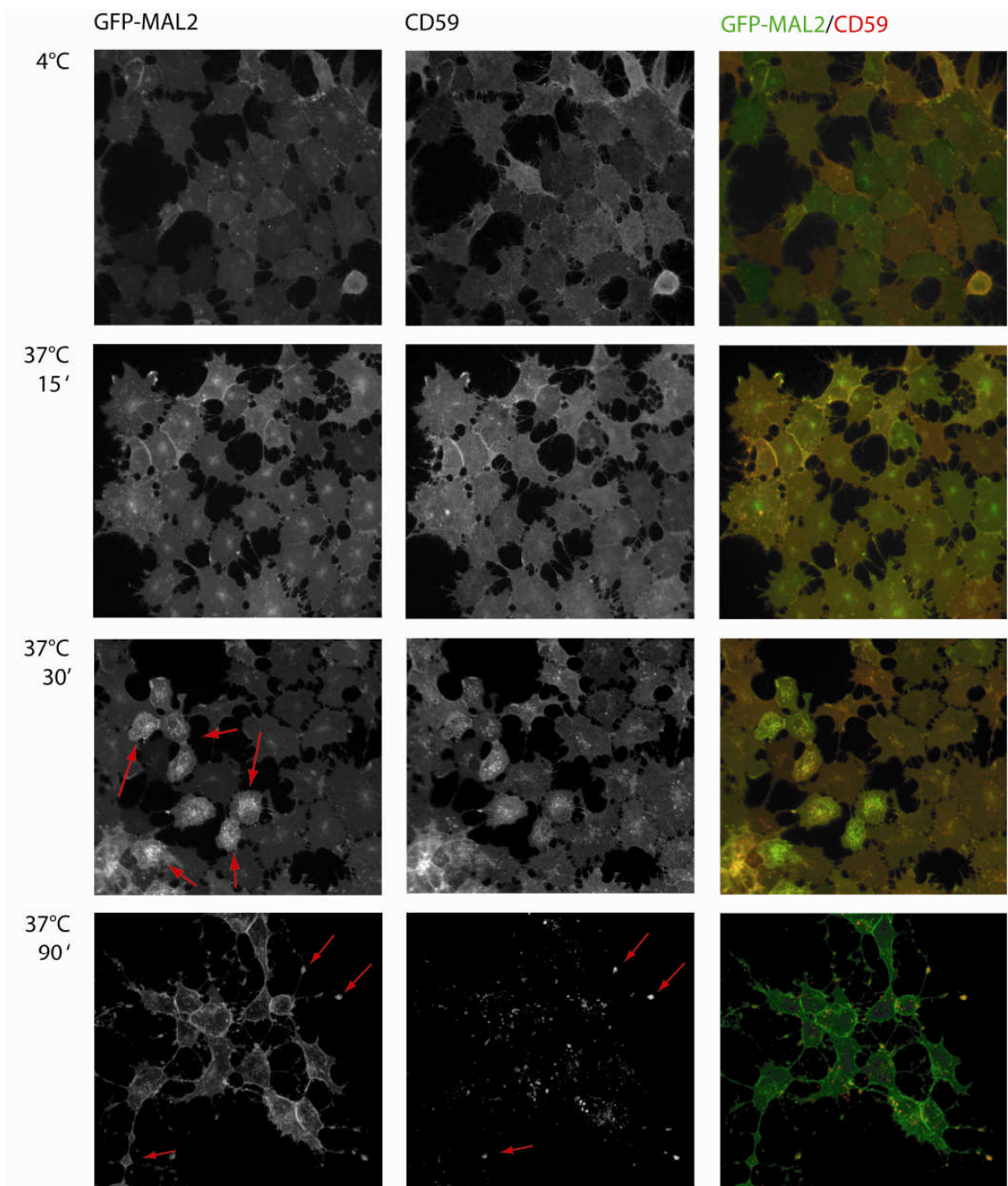


**Figura 33. Colocalización de GFP-MAL2 con diferentes marcares celulares en células HOG.** Las células cultivadas en MD se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 durante 30 minutos a 4°C, se lavaron e incubaron de nuevo durante 90 minutos a 18°C. A continuación, se fijaron, permeabilizaron y procesaron para su análisis mediante microscopía confocal utilizando un anticuerpo secundario contra el anticuerpo monoclonal anti-CD59 o anti-Rab11a. La imagen superior izquierda es una proyección de cortes confocales. (N, núcleo). Las ampliaciones de la derecha son cortes confocales de 0.8  $\mu\text{m}$ . Abajo se muestra una sección vertical x-z tomada según indica la línea roja que aparece en la sección horizontal correspondiente. Se muestra también su descomposición en parejas de colores. Puede verse la colocalización parcial de GFP-MAL2 con CD59 y Rab11a (flecha).

#### 4.3.3. Ensayos de transcitosis

Para analizar el transporte transcitótico de CD59, las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 durante 30 minutos a 4°C, se lavaron, incubaron a 37°C y fijaron a distintos tiempos. Después se trataron según se indica en el apartado de Materiales y Métodos para ser analizadas

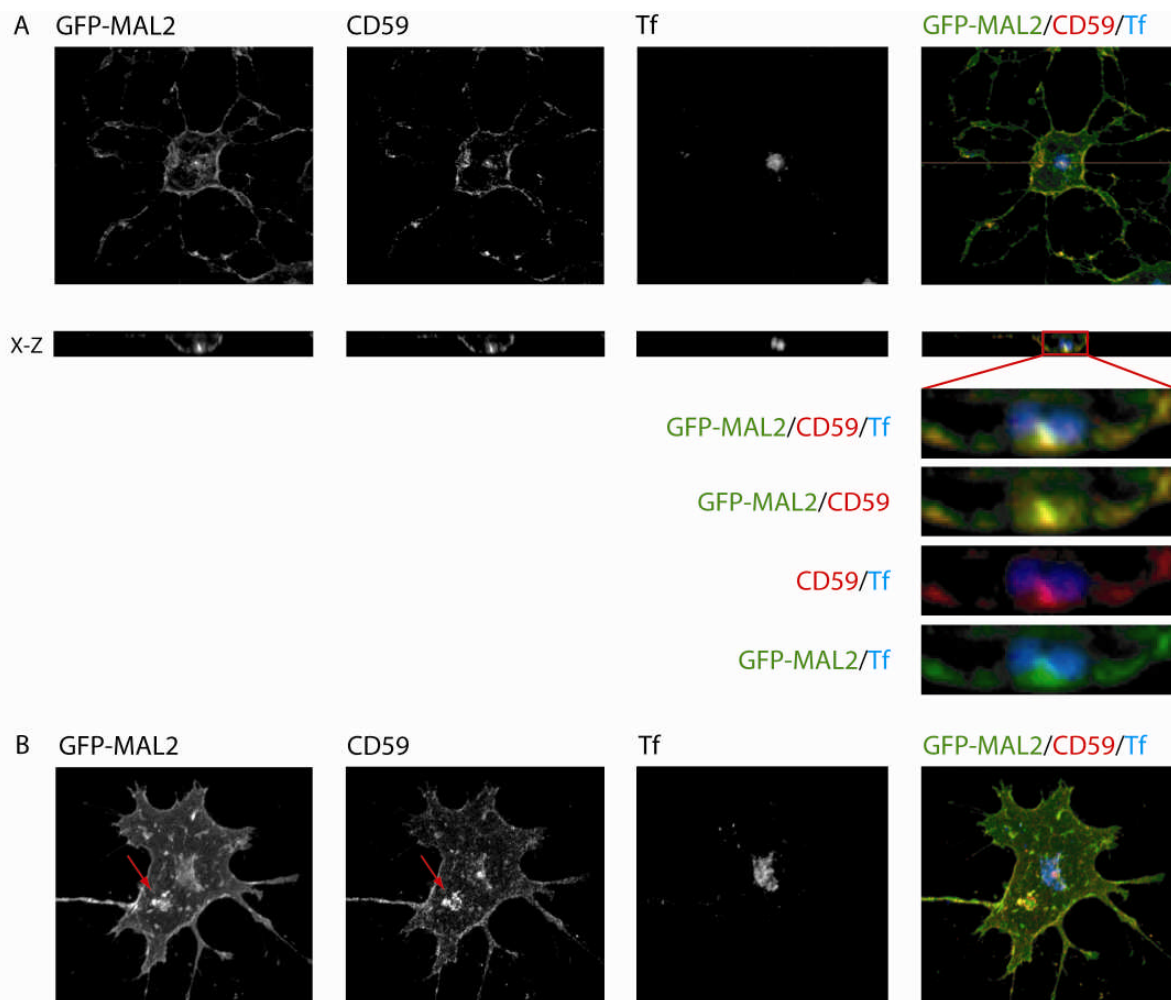
mediante microscopía de fluorescencia. La **Figura 34** muestra cómo CD59 se va internalizando, observándose, a los 30 minutos, el retículo tubular en algunas células. Según avanza CD59 en su movimiento transcitótico, se va dirigiendo a los procesos hasta, a los 90 minutos, encontrarse localizado en gran parte en las láminas semejantes a mielina.



**Figura 34. Distribución de GFP-MAL2 y CD59 durante su movimiento transcitótico.** Para analizar el transporte transcitótico de CD59, las células cultivadas en MD se incubaron 30 minutos con el anticuerpo anti-CD59 a 4°C, se lavaron, incubaron a 37°C y fijaron a los tiempos indicados en la figura. Después, se trataron

para ser analizadas mediante microscopía de fluorescencia. A los 30 minutos, ya se observa el retículo tubular en algunas células (flechas). A los 90 minutos, CD59 se encuentra localizado en gran parte en los procesos y en las láminas semejantes a mielina (flechas).

Es sabido que a 18°C, MAL2 es incapaz de salir del ARE/SAC y, por tanto, se acumula en él. Para inducir la acumulación de MAL2 y detener su movimiento en el ARE/SAC, las células GFP-MAL2/HOG se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 y con Tf a 18°C según se indica en el apartado de Materiales y Métodos. A continuación, las células se procesaron para ser analizadas por microscopía confocal (**Figura 35A**).



**Figura 35. Distribución subcelular de GFP-MAL2, CD59 y Tf en células GFP-MAL2/HOG.** A. Las células cultivadas en MD se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 durante 30 minutos a 4°C, se lavaron e incubaron de nuevo durante 90 minutos a 18°C y, a continuación, durante 60 minutos con Tf a 18°C. Después, las células se procesaron para su análisis mediante microscopía confocal. Las imágenes corresponden a la proyección de los cortes confocales. También se muestra una sección vertical x-z tomada según indica la línea roja que aparece en la sección horizontal correspondiente. Puede verse la colocalización de GFP-MAL2 con CD59 en un

compartimento que carece de Tf. B. En algunas células se encontró una estructura globular no pericentrosomal positiva para GFP-MAL2 y CD59 (flecha).

Las imágenes confocales mostraron colocalización de GFP-MAL2 y CD59 en un compartimento carente de Tf internalizada. Las imágenes también mostraron colocalización, al menos parcial, de CD59 y Tf, dato que coincide con el hecho de que CD59 pasa por el CE antes de llegar al ARE/SAC. Curiosamente, en estas células cultivadas a 18°C no se observó en ningún caso el retículo tubular positivo para GFP-MAL2 descrito anteriormente. Por otro lado, en algunas células se ha encontrado una estructura globular no pericentrosomal positiva para GFP-MAL2 y CD59 (**Figura 35B**).

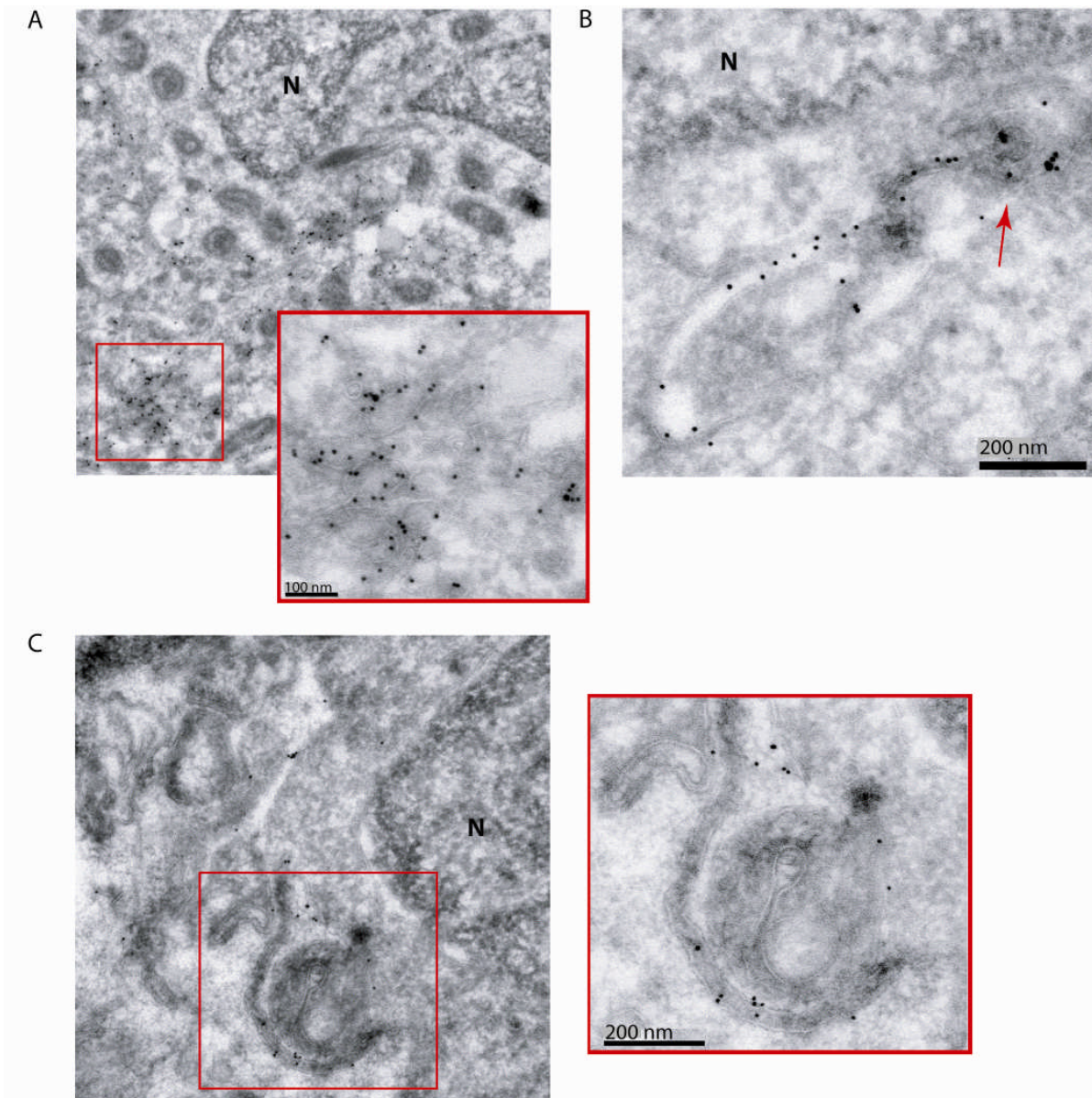
Para estudiar la distribución de GFP-MAL2 y CD59 desde otro enfoque, decidimos utilizar la técnica de inmunomicroscopía electrónica. Para ello, las células GFP-MAL2/HOG cultivadas en MD se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 durante 90 minutos a 18°C. Después, se fijaron y procesaron para la obtención de crio secciones ultrafinas según protocolo detallado en Materiales y Métodos. GFP-MAL2 se detectó mediante un anticuerpo policlonal anti-GFP y un anticuerpo secundario anti-Ig de conejo, y CD59, mediante un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón, ambos acoplados a oro coloidal.

Los resultados confirmaron la colocalización de GFP-MAL2 y CD59 en estructuras tubulovesiculares (**Figura 36A**). Además, se encontró un compartimento positivo para GFP-MAL2 y CD59 del que partían unas estructuras tubulares también positivas para ambas moléculas (**Figura 36B y C**).

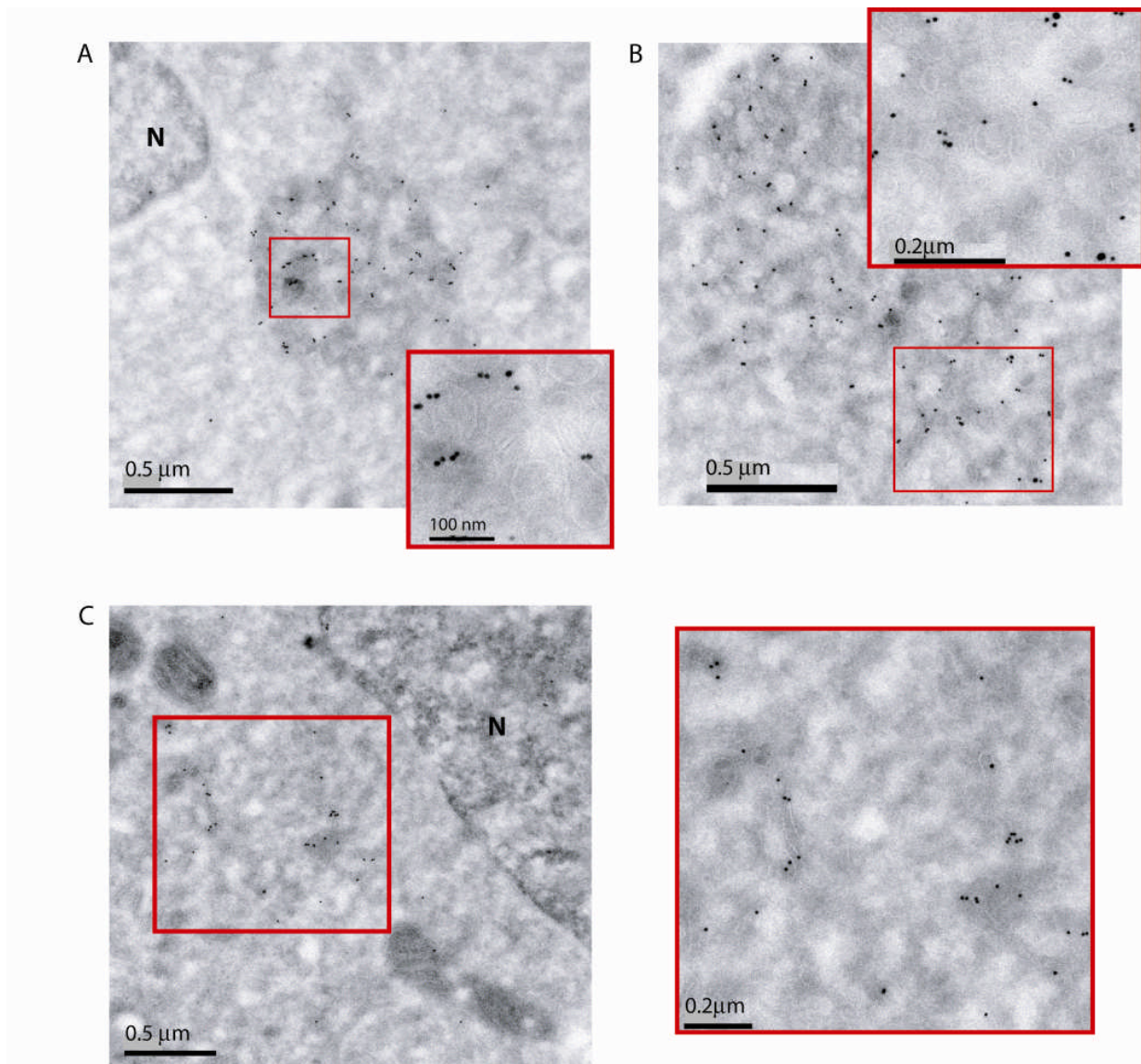
Para estudiar la distribución de CD59 y Tf, las células GFP-MAL2/HOG cultivadas en MD se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 y con Tf durante 90 minutos a 18°C. Después, se fijaron y procesaron para la obtención de crio secciones ultrafinas que fueron analizadas mediante inmunomicroscopía electrónica.

Los resultados muestran la localización de Tf en endosomas y MVBs (**Figura 37A**), algunos de los cuales muestran también colocalización con CD59 (**Figura 37B**). Se vió también una estructura perinuclear formada por elementos tubulovesiculares. (**Figura 37C**).





**Figura 36. Estudio de la distribución de GFP-MAL2 y CD59 mediante inmunomicroscopía electrónica.** Las células GFP-MAL2/HOG cultivadas en MD se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 durante 30 minutos a 4°C, se lavaron e incubaron de nuevo durante 90 minutos a 18°C. Después, se fijaron y procesaron para la obtención de criosecciones ultrafinas que fueron analizadas mediante inmunomicroscopía electrónica. A. Se observa la colocación de GFP-MAL2 (oro de mayor diámetro) y CD59 en estructuras tubulovesiculares. El cuadro muestra esas estructuras ampliadas. B y C. Se encontró un compartimento positivo para GFP-MAL2 y CD59 (flecha y cuadro) del que parten unas estructuras tubulares también positivas para ambas moléculas. El cuadro muestra esa estructura ampliada.

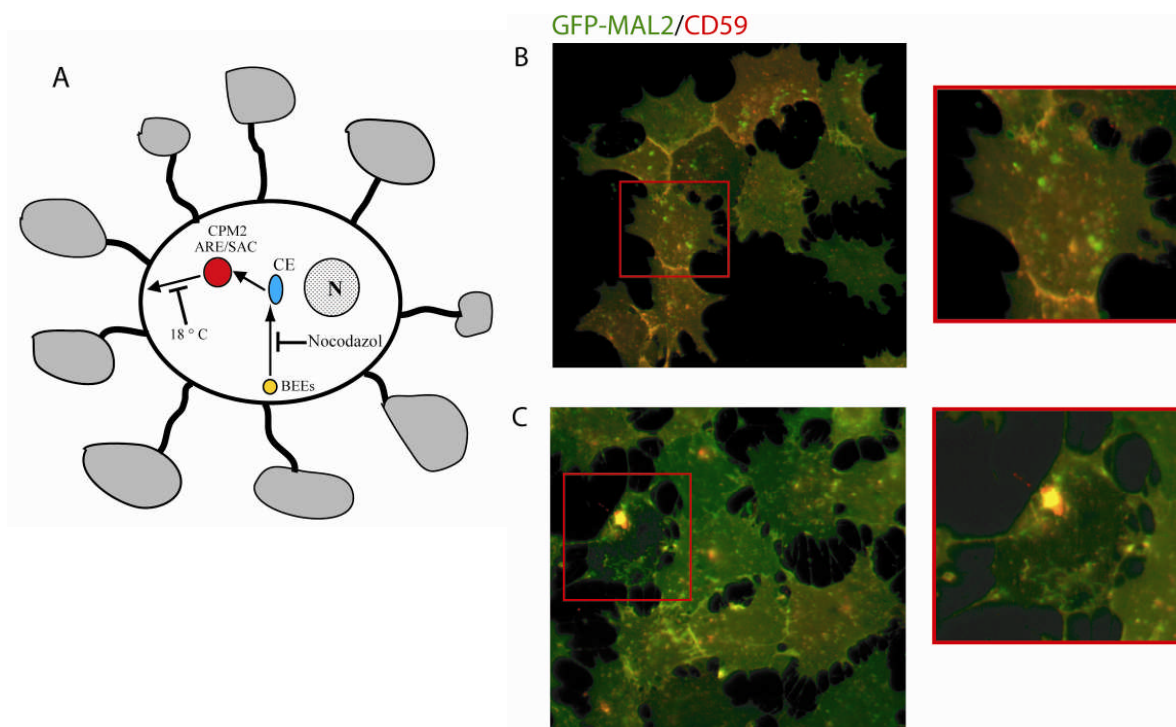


**Figura 37. Estudio de la distribución de CD59 y Tf mediante inmunomicroscopía electrónica.** Las células GFP-MAL2/HOG cultivadas en MD se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 y con Tf durante 90 minutos a 18°C. Después, las células se fijaron y procesaron para la obtención de crio secciones ultrafinas. El cuadro muestra esa estructura ampliada. Se observan estructuras multivesiculares con un marcaje positivo (oro de menor diámetro) para Tf (A) o bien para las dos moléculas, Tf y CD59 (B). Se observa también una estructura perinuclear formada por elementos tubulovesiculares (C).

Se sabe que la disgregación de los microtúbulos no impide el tránsito de las moléculas desde la membrana hasta los endosomas tempranos basolaterales (BEEs, *basolateral early endosomes*), pero sí impide el movimiento de las moléculas desde los BEEs hasta las siguientes estaciones de tráfico. Basándonos en este hecho, estudiamos el efecto del nocodazol y la incubación a 18°C durante la transcitosis de CD59. Las células GFP-MAL2/HOG se incubaron con el anticuerpo



anti-CD59 y, a continuación, en presencia de nocodazol 33  $\mu\text{M}$  a 37°C. Después se fijaron y procesaron para su análisis por microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo secundario contra el anticuerpo anti-CD59. La **Figura 38B** muestra la presencia de endosomas tempranos que contienen CD59 o GFP-MAL2. Paralelamente, tras la incubación anterior con nocodazol, las células se lavaron e incubaron durante 120 minutos a 18°C en ausencia de nocodazol, tras lo cual se fijaron y procesaron para ser analizadas por microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo secundario contra el anticuerpo anti-CD59. Los resultados muestran la colocalización de GFP-MAL2 y CD59 en el CPM2 (**Figura 38C**).



**Figura 38. Efecto del nocodazol durante el movimiento transcitótico de CD59.** A. Representación esquemática del efecto del nocodazol y la incubación a 18°C durante la transcitosis de CD59. CD59 es endocitado desde la membrana plasmática hasta los BEEs, proceso que no depende de microtúbulos. A continuación, CD59 saldría de los BEEs hacia el CE y el CPM2 (que equivaldría al ARE/SAC). Este paso depende de microtúbulos, por lo que sería impedido por el nocodazol, que provocaría la acumulación de CD59 en los BEEs. En ausencia de nocodazol, CD59 llega al ARE/SAC. Después, si se incubase a 37°C, CD59 saldría de él y llegaría a los procesos, pero la incubación a 18°C impide esta salida y CD59 se acumula en el ARE/SAC. B. Las células GFP-MAL2/HOG se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 durante 30 minutos a 4°C, se lavaron e incubaron en presencia de nocodazol 33  $\mu\text{M}$  a 37°C. Después se fijaron y procesaron para su análisis por microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo secundario contra el anticuerpo anti-CD59. El cuadro muestra una ampliación en la que se observan endosomas tempranos que contienen CD59 o GFP-MAL2. C. Tras la incubación anterior, las células fueron lavadas e incubadas durante 120 minutos a 18°C en ausencia de

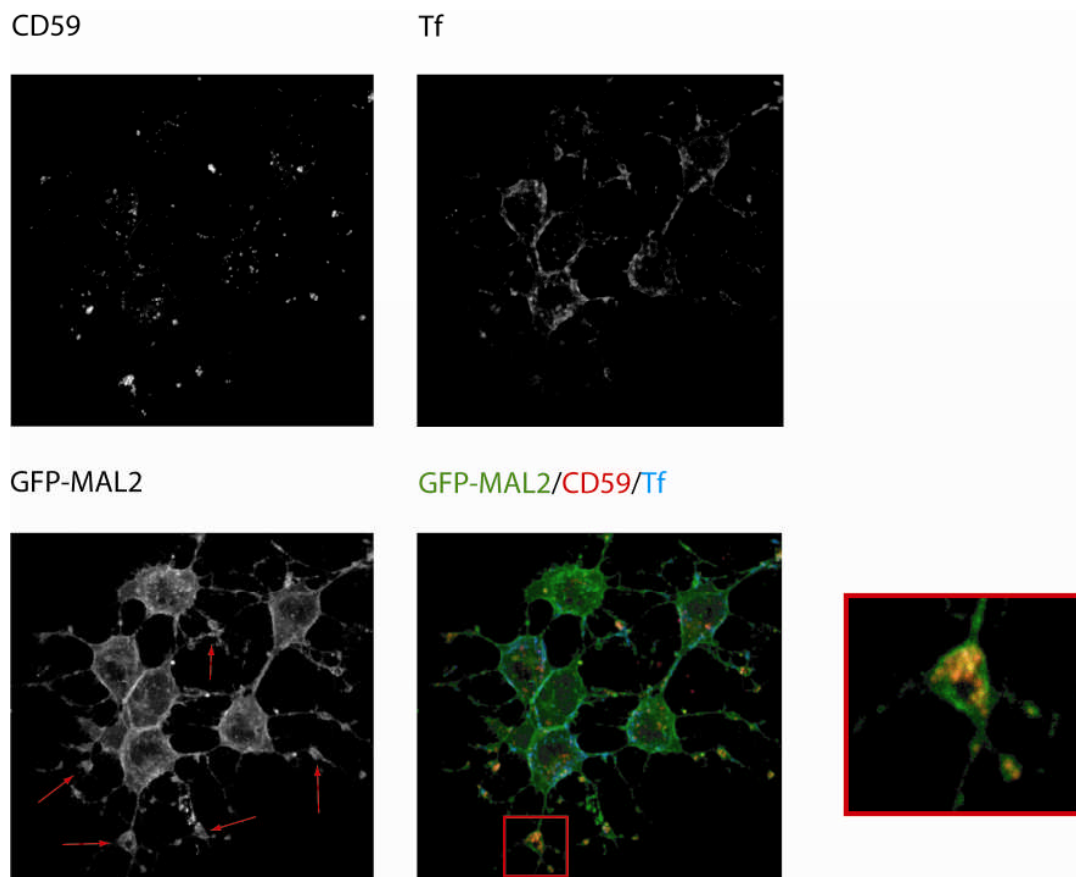
nocodazol, tras lo cual se fijaron y se procesaron para ser analizadas por microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo secundario contra el anticuerpo anti-CD59. Se observa la colocalización de CD59 con GFP-MAL2 en el CPM2 (cuadro).

En resumen, los resultados muestran que, cuando las células se incuban en presencia de nocodazol, GFP-MAL2 y CD59 aparecen en endomas tempranos, sin ser capaces de continuar su camino y alcanzar compartimentos posteriores, mientras que, cuando se elimina el nocodazol del medio, GFP-MAL2 y CD59 siguen su movimiento por la célula y alcanzan el CPM2. Como era de esperar, al incubar las células a 18°C, aumenta la colocalización de GFP-MAL2 con CD59 en el CPM2.

#### 4.3.4. Estudio de la polarización celular

Para estudiar la polarización de las células cultivadas en MD, se analizó la distribución de CD59 –una molécula de distribución apical– y Tf –de distribución basolateral–. Para ello, las células GFP-MAL2/HOG se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 durante 30 minutos a 4°C, se lavaron e incubaron a 18°C durante 90 minutos. Después, se incubaron 60 minutos con Tf a 18°C y, a continuación, a 37°C durante 30 minutos para permitir el avance de las moléculas. Finalmente, las células se procesaron para ser analizadas por microscopía confocal (**Figura 39**).

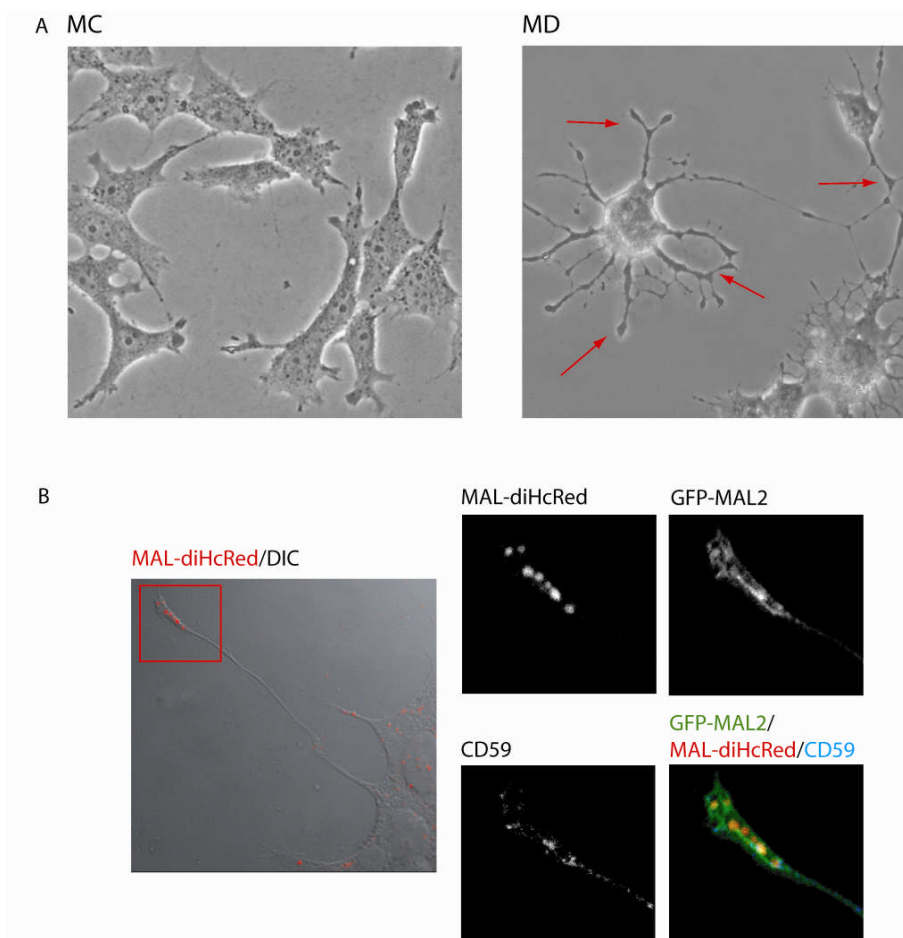
Los resultados mostraron que CD59, tras haberse acumulado en el ARE/SAC, se dirigió y acumuló en los procesos y en las estructuras semejantes a vainas de mielina, que equivaldrían al dominio apical. Por el contrario, Tf, que es escasa en los procesos, se distribuyó mayoritariamente en la membrana plasmática, que vendría a corresponder al dominio basolateral. Esta segregación de las moléculas apicales y basolaterales en dominios distintos sugiere un proceso de polarización celular.



**Figura 39. Polarización celular: distribución de CD59 y Tf en células GFP-MAL2/HOG.** Para analizar el transporte transcitótico de CD59, las células se incubaron con el anticuerpo anti-CD59 y con Tf a 18°C y, a continuación, se incubaron a 37°C durante 30 minutos para permitir el avance de las moléculas. Después, se trataron para ser analizadas mediante microscopía confocal. Las imágenes corresponden a la proyección de los cortes obtenidos. Se observa la segregación de CD59 y Tf en distintos dominios de membrana. Se ven también estructuras semejantes a vainas de mielina (flechas). El cuadro rojo muestra un aumento de una de esas estructuras conteniendo vesículas enriquecidas en GFP-MAL2 y CD59.

Como se ha explicado anteriormente, hemos observado la formación de estructuras semejantes a vainas de mielina en células HOG y Oli-neu cultivadas en condiciones de diferenciación. Estas estructuras ya habían sido previamente descritas en varios trabajos realizados con cultivos primarios de OLs y co-cultivos con neuronas (cultivos mixtos), y podrían ser consideradas como las estructuras equivalentes a la mielina en los cultivos *in vitro*, dado que, además, son ricas en proteínas de mielina. Para verificar si las estructuras observadas en nuestros sistemas celulares estaban también enriquecidas en proteínas apicales y de mielina, se realizaron análisis de inmunofluorescencia en células transfectadas con MAL –una proteína de mielina–, MAL2 y la proteína apical CD59. Los resultados confirmaron la presencia de GFP-MAL2, MAL-

diHcRed y CD59 en esas estructuras (**Figura 40**).

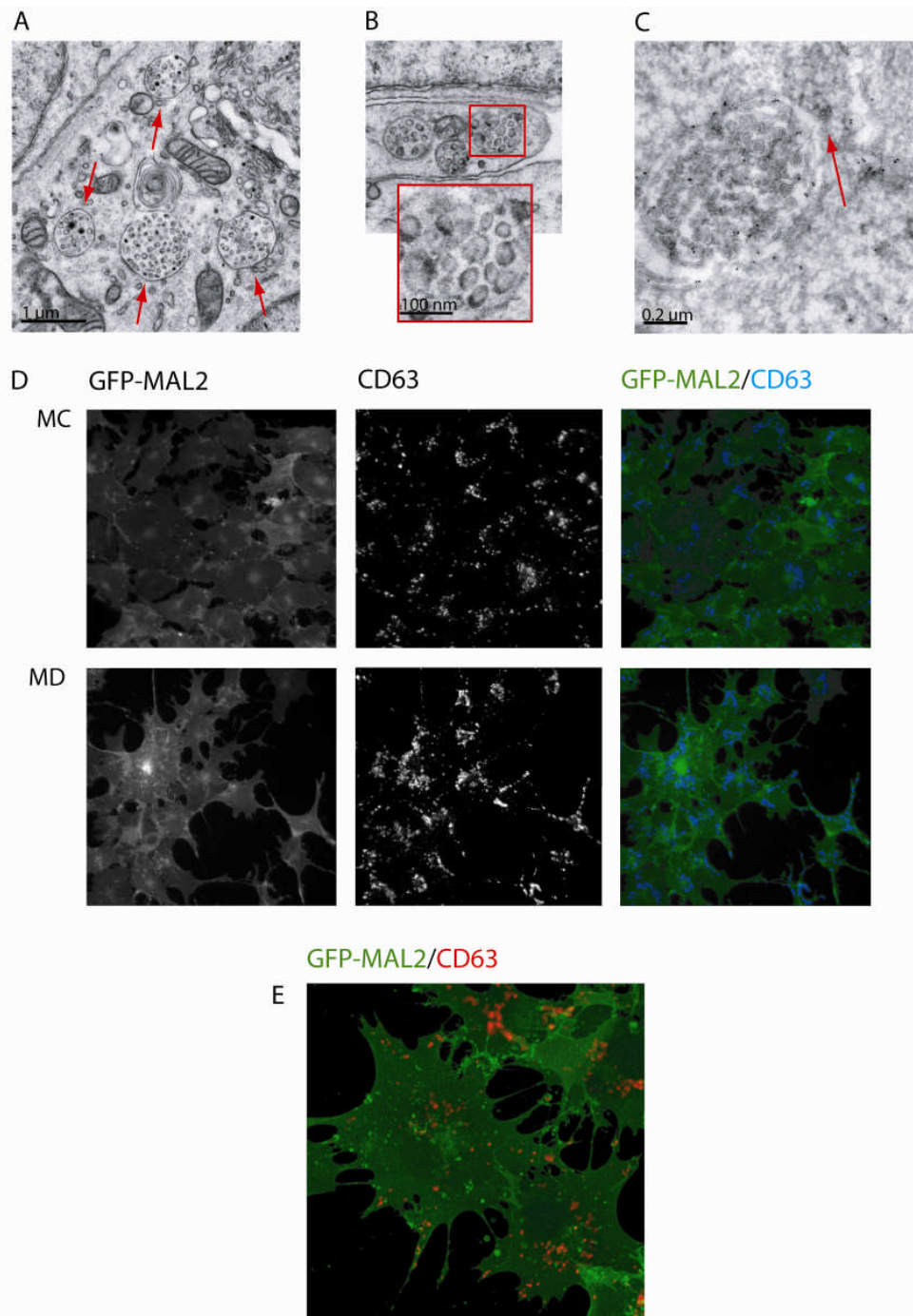


**Figura 40. Expresión de MAL y MAL2 exógenos en estructuras semejantes a vainas de mielina.** A. Imagen de contraste de fases de células GFP-MAL2/HOG cultivadas durante dos días en MC y MD. Se aprecian estructuras semejantes a vainas de mielina (flechas). B. Células GFP-MAL2/MAL-diHcRed/HOG cultivadas en MD fueron incubadas 30 minutos a 4°C con el anticuerpo anti-CD59, 90 minutos a 18°C y otros 30 minutos a 37°C para permitir el avance de la moléculas hacia su destino. Después, las células fueron fijadas, permeabilizadas y analizadas mediante microscopía confocal. Las imágenes corresponden a la proyección de los planos confocales. El cuadro rojo muestra una imagen –mostrada en mayor detalle a la derecha– de una lámina semejante a mielina conteniendo vesículas enriquecidas en MAL-diHcRed, GFP-MAL2 y CD59.

#### 4.3.5. Exosomas

Durante el análisis ultraestructural, se encontró marcaje de GFP-MAL2 en cuerpos MVBs (**Figura 41**). De hecho, en las células HOG se observó una gran cantidad de esas estructuras (**Figura 41A**). Algunos de los MVBs se encontraron en los extremos de los procesos (**Figura 41B**), lo que sugirió que podría tratarse de exosomas, ya que, además, el tamaño de las vesículas

intraluminales, –alrededor de los 60nm– coincidía con el tamaño que se ha descrito para los exosomas. No obstante, el análisis posterior mostró un marcaje positivo para GFP-MAL2, (Figura 41C) aunque no para un marcador de exosomas como CD63 (Figura 41D y E).



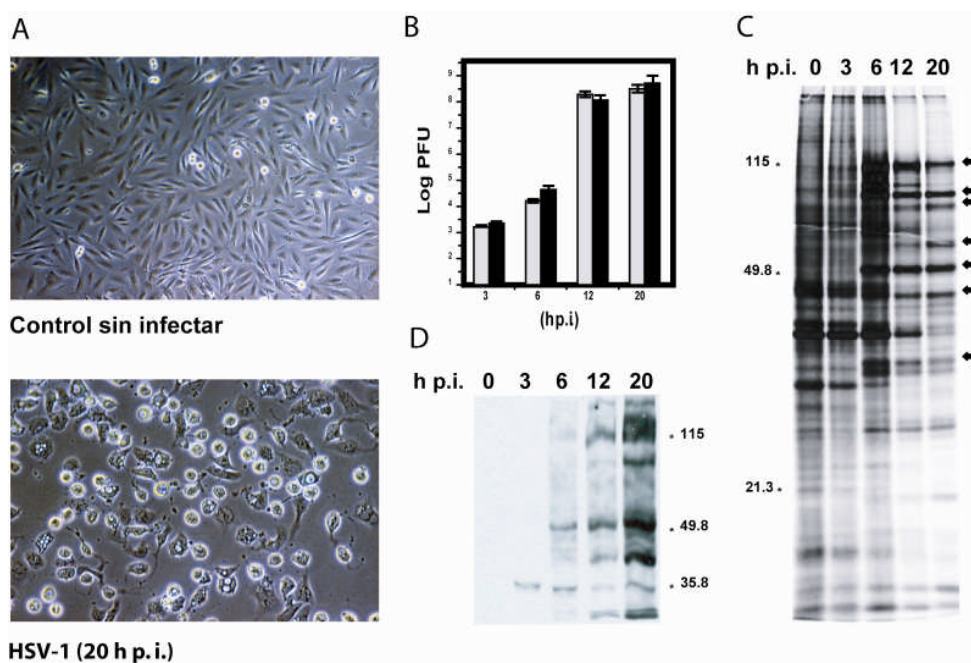
**Figura 41. Cuerpos multivesiculares.** A. Células HOG cultivadas en MD se fijaron, procesaron mediante inclusión en resina Epon y analizaron mediante microscopía electrónica. Se encontraron numerosos MVBs (flechas). Algunos de ellos, se localizaron en los extremos de los procesos (B). C. Las células GFP-MAL2/HOG cultivadas en MD se fijaron y procesaron para la obtención de criosecciones ultrafinas que fueron analizadas mediante inmunomicroscopía electrónica con un anticuerpo anti-GFP. La imagen muestra una de estas



estructuras, positiva para GFP-MAL2, fusionándose con la membrana plasmática (flecha). D. y E. Las células GFP-MAL2/HOG se incubaron con un anticuerpo anti-CD63 y se procesaron para su análisis mediante microscopía de fluorescencia convencional (D) y confocal (E). D. Los MVBs, presentan una distribución perinuclear en las células cultivadas en MC, mientras que se localizan a lo largo de los procesos cuando se cultivan en MD. E. El análisis confocal no mostró colocalización entre ambos marcadores.

#### 4.4. Infección de OLs con HSV-1: estudios preliminares con la línea celular KG-1C

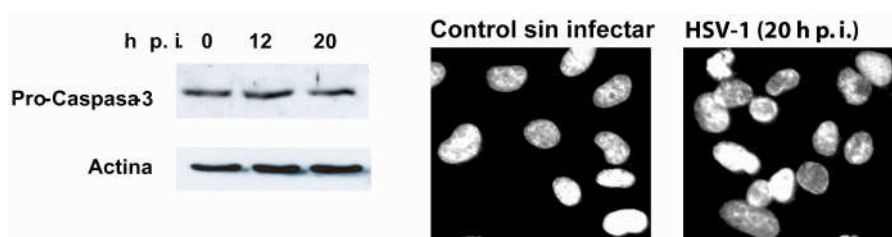
Dada la imposibilidad de inducir un fenotipo polarizado en la línea celular KG-1C, los primeros experimentos con estas células se realizaron en MC. Las células cultivadas en este medio se infectaron a una m.d.i.=10. Según muestra la **Figura 42A y B**, la infección se caracterizó por una alta productividad viral –similar a la observada en células Vero, utilizadas como control de efectividad infecciosa– y una notable progresión del efecto citopático (ECP), que era acusado a las 20 h p.i. Tras la infección, tuvo lugar un significativo proceso de *shut-off* de la expresión de proteínas celulares paralelo a la síntesis de proteínas virales (**Figura 42C**) y, mediante inmunotransferencia, se detectó la aparición de proteínas virales con un anticuerpo anti-HSV-1 (**Figura 42D**).



**Figura 42. Infección de la línea celular KG-1C con HSV-1.** A. Las células cultivadas en MC se infectaron con HSV-1 a una m.d.i.=10. El efecto citopático de las células infectadas se visualizó mediante microscopía de contraste de fases. B. Susceptibilidad de las células a la infección. Se infectaron células Vero (barras oscuras) y

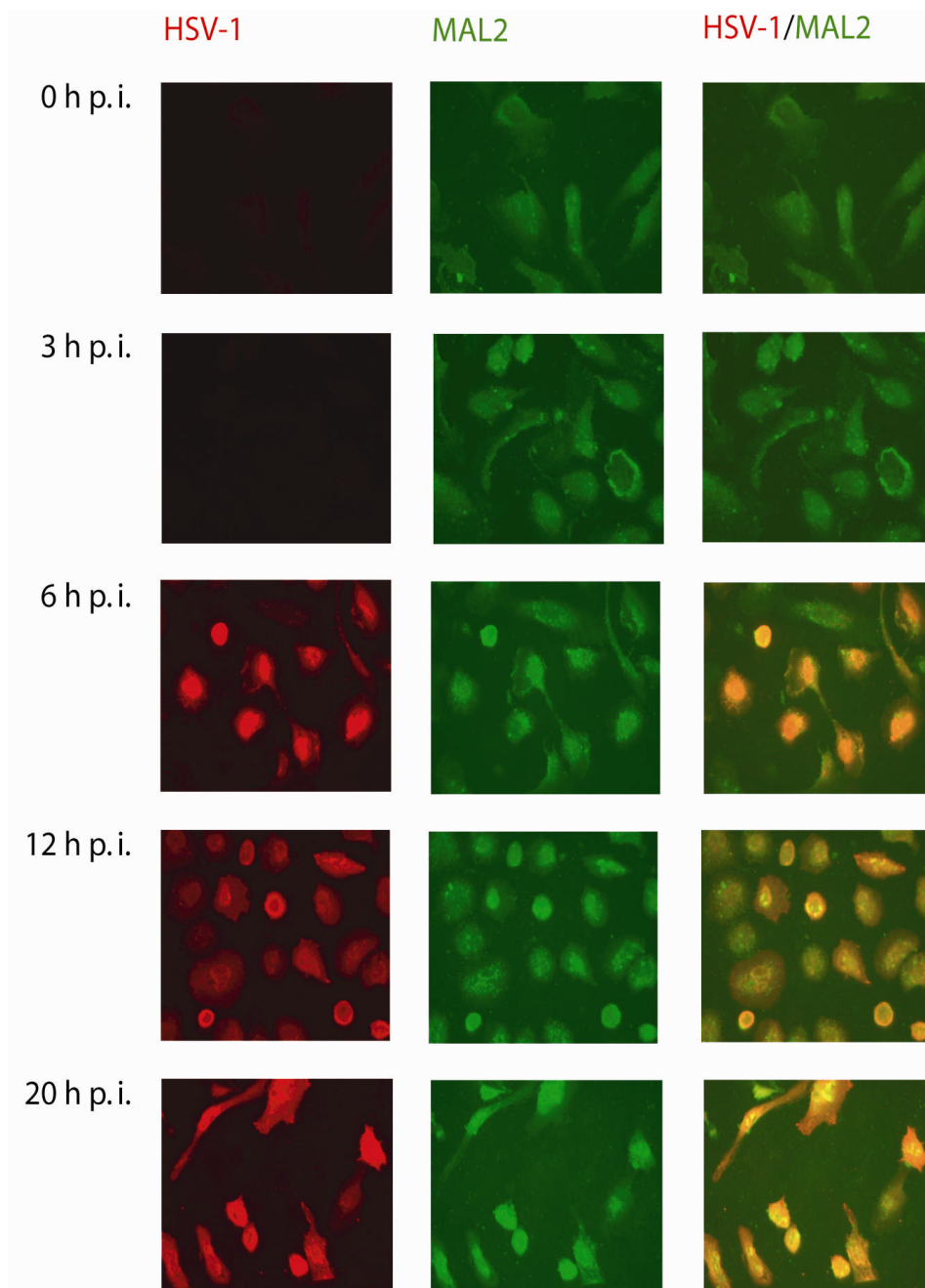
KG-1C (barras claras) a una m.d.i.=1. Tras los tiempos indicados, las células se recogieron y se tituló la productividad viral de los extractos obtenidos. Cada valor representa la media de seis muestras. C. Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas marcadas con  $^{35}\text{S}$  de células infectadas a una m.d.i.=10, a distintas h p. i. Las flechas indican proteínas virales. D. Se analizaron 60 mg de extractos celulares totales a las h p.i. indicadas mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal anti-HSV-1

Para estudiar el tipo de muerte inducida, se analizó la integridad de la proenzima pro-caspasa-3. Los análisis de apoptosis no mostraron evidencias de condensación de cromatina ni cuerpos apoptóticos y, además, los análisis bioquímicos mostraron la integridad de pro-caspasa-3, no detectándose caspasa-3 activa, lo que sugiere que, al menos en este sistema, no se produce apoptosis (**Figura 43**).



**Figura 43 E. Efecto de la infección de la línea celular KG-1C sobre la inducción de apoptosis.** Las células se infectaron durante los tiempos indicados. A continuación, se analizaron mediante inmunotransferencia 60 mg de proteína con un anticuerpo policlonal anti-caspasa-3. La banda corresponde al peso total de la proenzima (32 kDa). Las imágenes de microscopía de fluorescencia corresponden a la tinción nuclear realizada con DAPI.

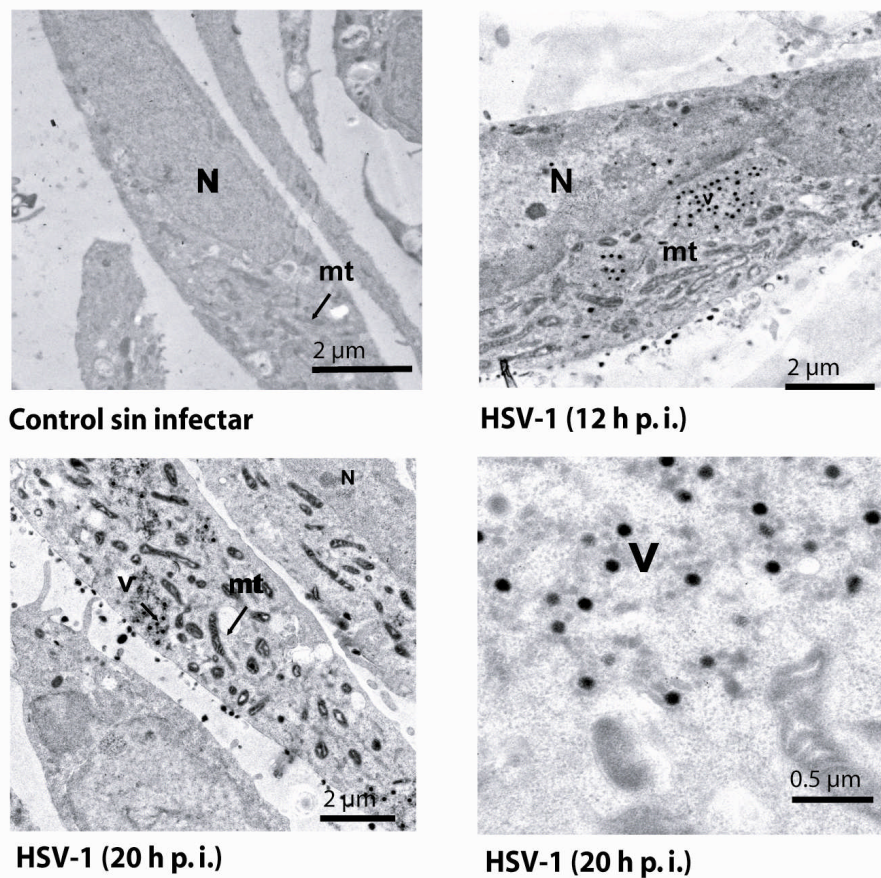
Para realizar los análisis preliminares de MAL2 en la línea celular KG-1C, las células fueron cultivadas en MC, infectadas a una m.d.i.=1 y procesadas para su análisis mediante microscopía de fluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-HSV-1 y otro monoclonal anti-MAL2. Tras la infección, los resultados revelaron un cierto aumento en la detección de esta proteína (**Figura 44**). No obstante, cuando se procedió a cultivar las células en condiciones de diferenciación, ninguno de los distintos medios utilizados produjo cambios apreciables en los marcadores moleculares ni en la morfología de esta línea celular, por lo que, para futuros análisis sobre el efecto de la infección en la diferenciación oligodendrocítica, decidimos recurrir a otras líneas celulares análogas.



**Figura 44. Efecto de la infección de la línea celular KG-1C sobre MAL2.** A las h p. i. indicadas, m.d.i.=1, las células se marcaron con anticuerpos anti-HSV-1 y anti-MAL2 para, a continuación, ser analizadas mediante microscopía de fluorescencia.

Por último, los análisis de microscopía electrónica en KG-1C mostraron la acumulación de mitocondrias con una estructura condensada –respiratoriamente activa– localizadas cerca de los agrupamientos de partículas virales recién formadas (**Figura 45**).

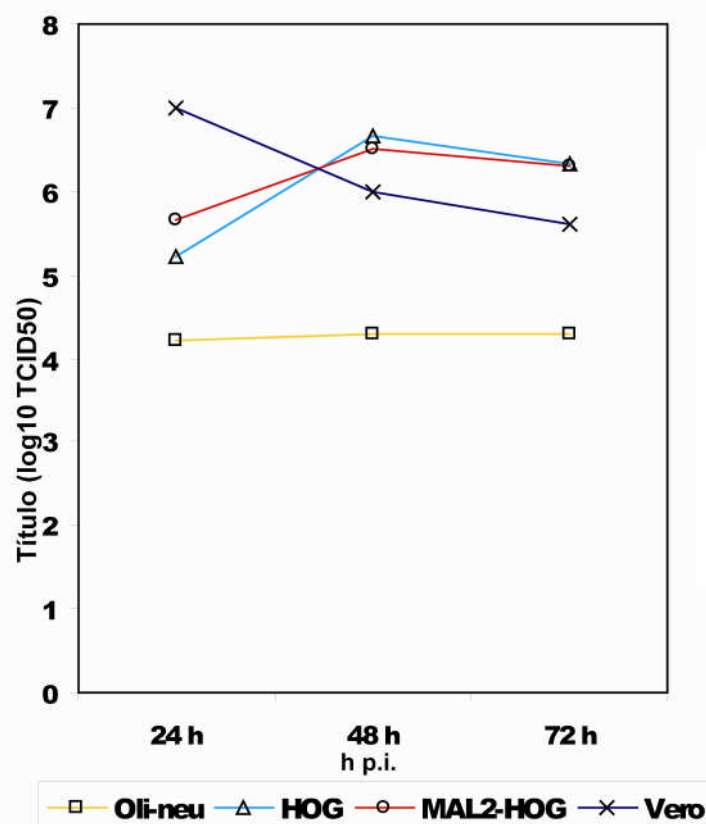




**Figura 45. Efecto de la infección de la línea celular KG-1C sobre la movilidad mitocondrial.** Las células se infectaron a una m.d.i.=10 durante las horas señaladas en la figura. Tras la infección, las células se recogieron y procesaron para su análisis mediante microscopía electrónica. N, núcleo; mt, mitocondrias; v, viriones.

#### 4.5. Infección de las líneas Oli-neu y HOG

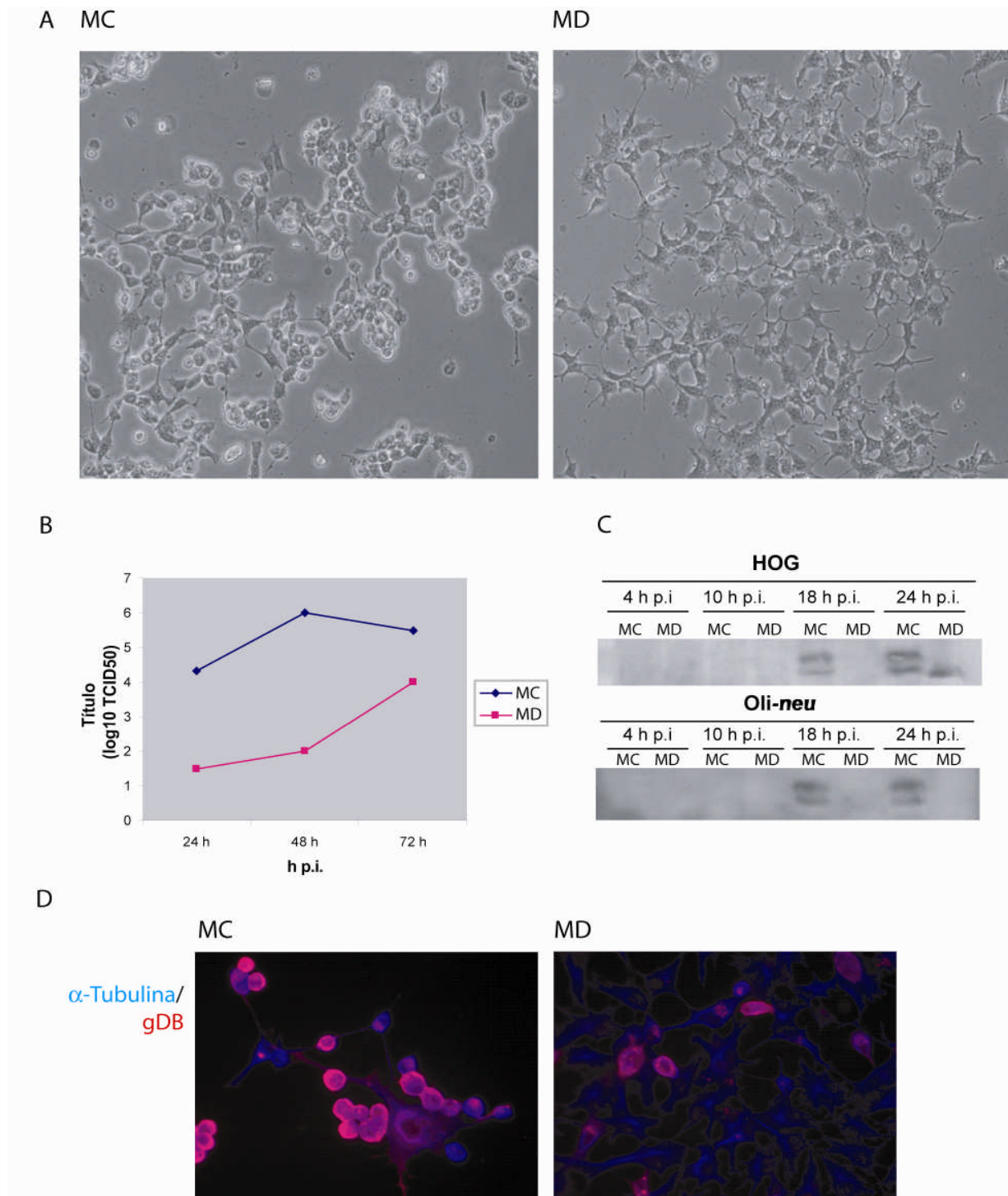
Los estudios sucesivos se realizaron con las líneas celulares HOG y Oli-neu, que ya han demostrado su capacidad para diferenciarse *in vitro* con el medio de cultivo adecuado. Como estudio comparativo con las células Vero, las líneas celulares HOG, GFP-MAL2/HOG, Oli-neu y Vero se infectaron con HSV-1 a una m.d.i.=0.1. Tras los tiempos indicados, las células se recogieron y titularon los extractos mediante TCID<sub>50</sub> (**Figura 46**). La productividad viral de la línea HOG fue elevada, comparable a la de la línea control. No se observaron diferencias entre las líneas HOG sin transfectar y GFP-MAL2/HOG. Por el contrario, las células Oli-neu mostraron una productividad viral muy inferior a la de las otras líneas.



**Figura 46. Infección de líneas oligodendrocíticas con HSV-1.**

Se infectaron células Oli-neu, HOG, GFP-MAL2/HOG, y Vero (control) cultivadas en MC, a una m.d.i.=0.1. A los tiempos señalados, las células se recogieron y los extractos se titularon mediante TCID<sub>50</sub>.

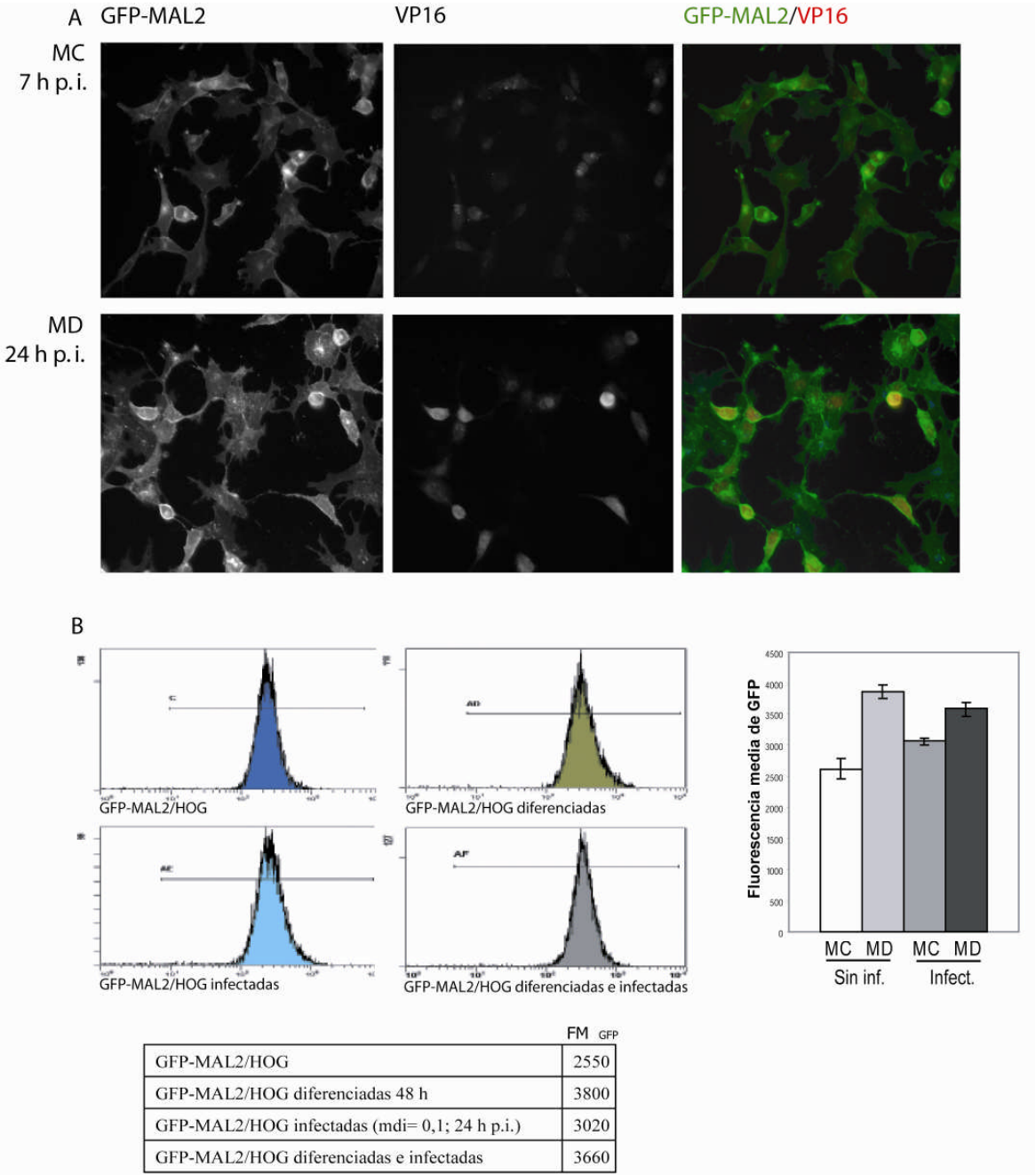
A continuación, se llevó a cabo un estudio comparativo de la infección en células diferenciadas o cultivadas en medio MC. Células HOG fueron cultivadas en MC o MD e infectadas con HSV-1 a una m.d.i.=0.1. El ECP a las 48 horas fue notoriamente inferior en las células cultivadas en MD (**Figura 47A**). Además, el análisis de los extractos celulares obtenidos también mostró un título sensiblemente inferior en dichas células (**Figura 47B**). Los análisis mediante inmunotransferencia de extractos celulares de células HOG y Oli-neu cultivadas en MC y MD, usando un anticuerpo anti gDB, mostraron la aparición de proteínas virales a las 18 h p.i. También, y en este sentido, observamos que la cinética de aparición de proteínas virales en células cultivadas en MD estaba retrasada respecto a las células cultivadas en MC (**Figura 47C**). Por último, se realizó un análisis de inmunofluorescencia a las 48 h p.i con anticuerpos anti- $\alpha$ -Tubulina, para visualizar las células, y anti-gDB, para detección viral. Las imágenes mostraron menos marcaje para proteínas virales en células diferenciadas (**Figura 47D**).



**Figura 47. Efecto de la diferenciación celular en la infección con HSV-1.** Las células se cultivaron en MC o MD y se infectaron con HSV-1 a una m.d.i.=0.1. A. Efecto citopático. Se muestran las imágenes de campo claro de las células HOG a las 48 h p.i. B. Productividad viral. Titulación mediante TCID<sub>50</sub> de los extractos celulares. C. Inmunotransferencia de los extractos celulares de células HOG y Oli-neu cultivadas en MC y MD, usando un anticuerpo policlonal anti-gDB. D. Inmunofluorescencia a las 48 h p.i con anticuerpos anti- $\alpha$ -Tubulina, para visualizar las células, y anti-gDB, para detectar el virus.

4.5.1. Efecto de la infección sobre MAL2

El efecto de la infección sobre la expresión de MAL2 se analizó mediante inmunofluorescencia (**Figura 48A**). Para ello, se cultivaron células GFP-MAL2/HOG en MC y MD, se infectaron a una m.d.i.=1 y se fijaron a los tiempos indicados. La detección del virus se llevó a cabo con un anticuerpo anti-VP16.



**Figura 48. Efecto de la infección por HSV-1 sobre la detección de GFP-MAL2.** A. Las células GFP-MAL2/HOG cultivadas en MC y en MD fueron infectadas a una m.d.i. =1, fijadas a los tiempos indicados y

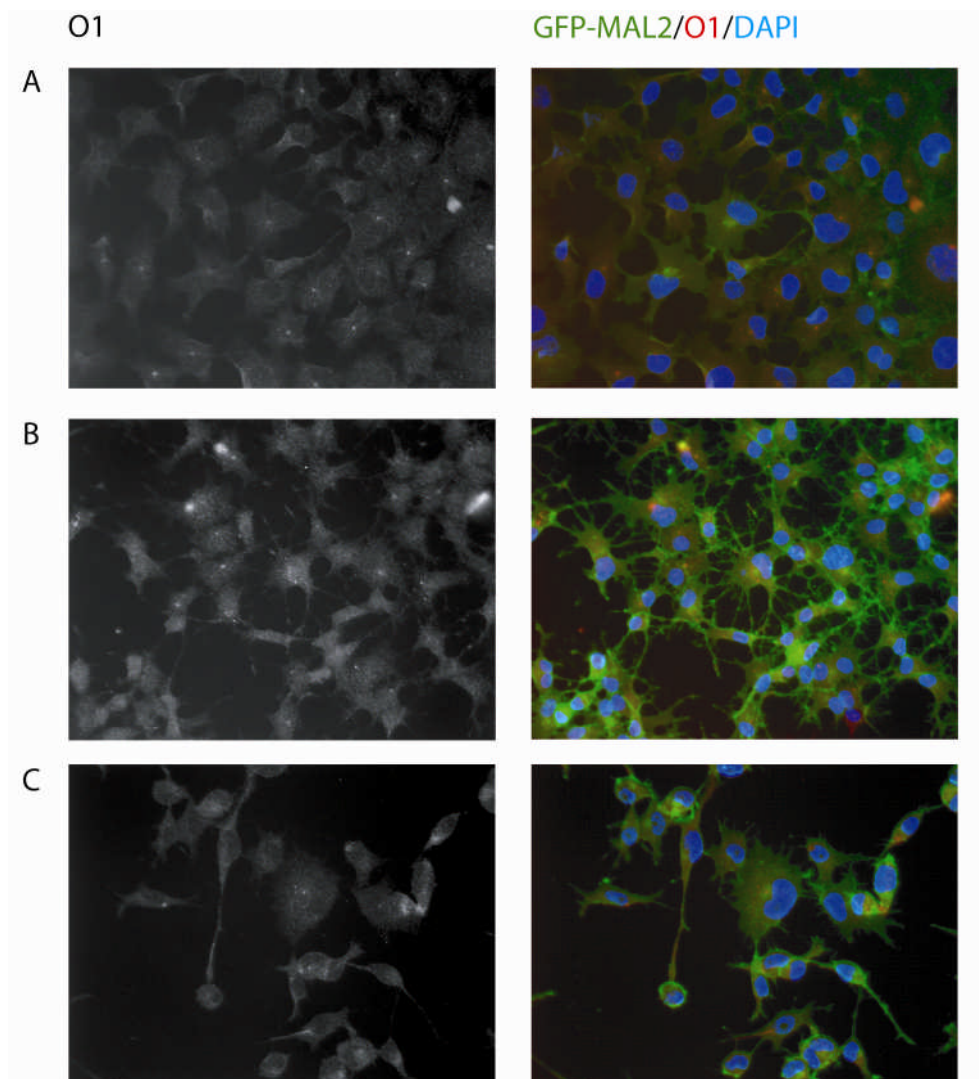
tratadas para ser analizadas por microscopía de fluorescencia. La detección del virus se realizó con el anticuerpo anti-VP16. B. Las células cultivadas en MC y en MD fueron infectadas a una m.d.i.=0.1, fijadas a las 24 h p. i., procesadas y analizadas para su análisis mediante citometría de flujo. En la tabla aparecen las medidas obtenidas de la fluorescencia media de GFP (FM GFP).

En la **Figura 48A** puede observarse que, en aquellas células en las que se detectan más proteínas virales, GFP-MAL2 muestra también mayor fluorescencia. Además, los análisis realizados mediante citometría de flujo mostraron también un ligero aumento de la fluorescencia media de GFP en las células infectadas cultivadas en condiciones de crecimiento (**Figura 48B**).

Se consideró la posibilidad de que el aumento de la detección de MAL2 en las células infectadas se debiera a la inducción por parte del virus del proceso de diferenciación celular. Para comprobar si el virus inducía diferenciación, las células GFP-MAL2/HOG se cultivaron en MC o MD, se fijaron y procesaron para su análisis mediante microscopía de fluorescencia con el anticuerpo contra el marcador de diferenciación oligodendrocítico O1. Además, células cultivadas en MC se infectaron a una m.d.i.=0.1, y se fijaron a las 24 h p.i. para su posterior estudio comparativo con la diferenciación que producen tanto la infección como el cultivo en MD (**Figura 49**).

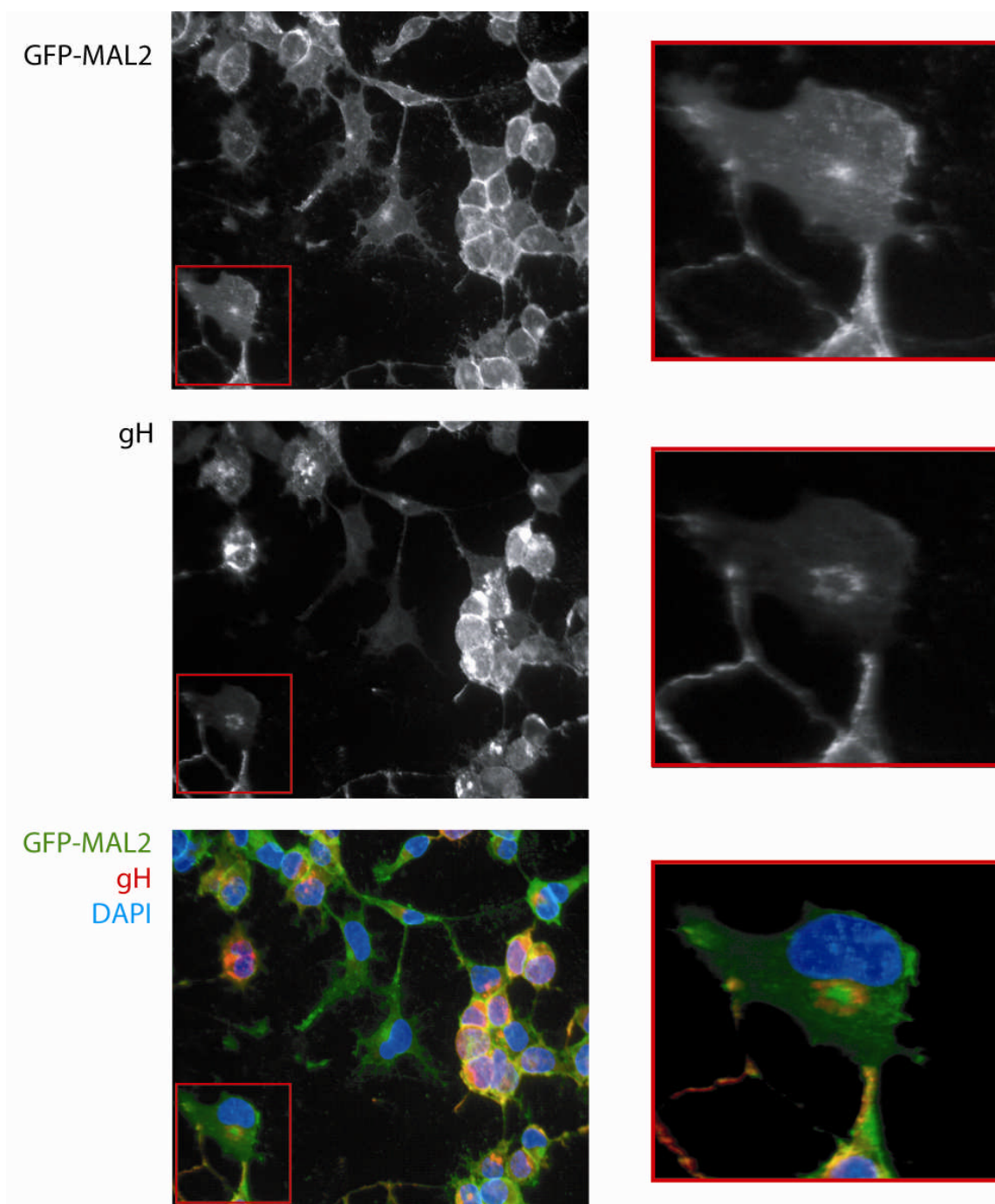
Los resultados muestran un claro aumento del marcador de diferenciación cuando las células se cultivan en condiciones de diferenciación (**Figura 49B**) con respecto a las células cultivadas en condiciones de crecimiento (**Figura 49A**). Aunque el incremento no es tan acusado, tras la infección también se percibe cierto aumento de la detección de O1 (**Figura 49C**) en comparación con las células no infectadas cultivadas en MC (**Figura 49A**).





**Figura 49. Efecto de la infección sobre la diferenciación celular.** Las células GFP-MAL2/HOG se fijaron y procesaron para su análisis mediante microscopía de fluorescencia con el anticuerpo monoclonal anti-O1. A. Células cultivadas en MC. B. Células cultivadas en MD. C. Células cultivadas en MC e infectadas a una m.d.i=0.1 a las 24 h p.i.

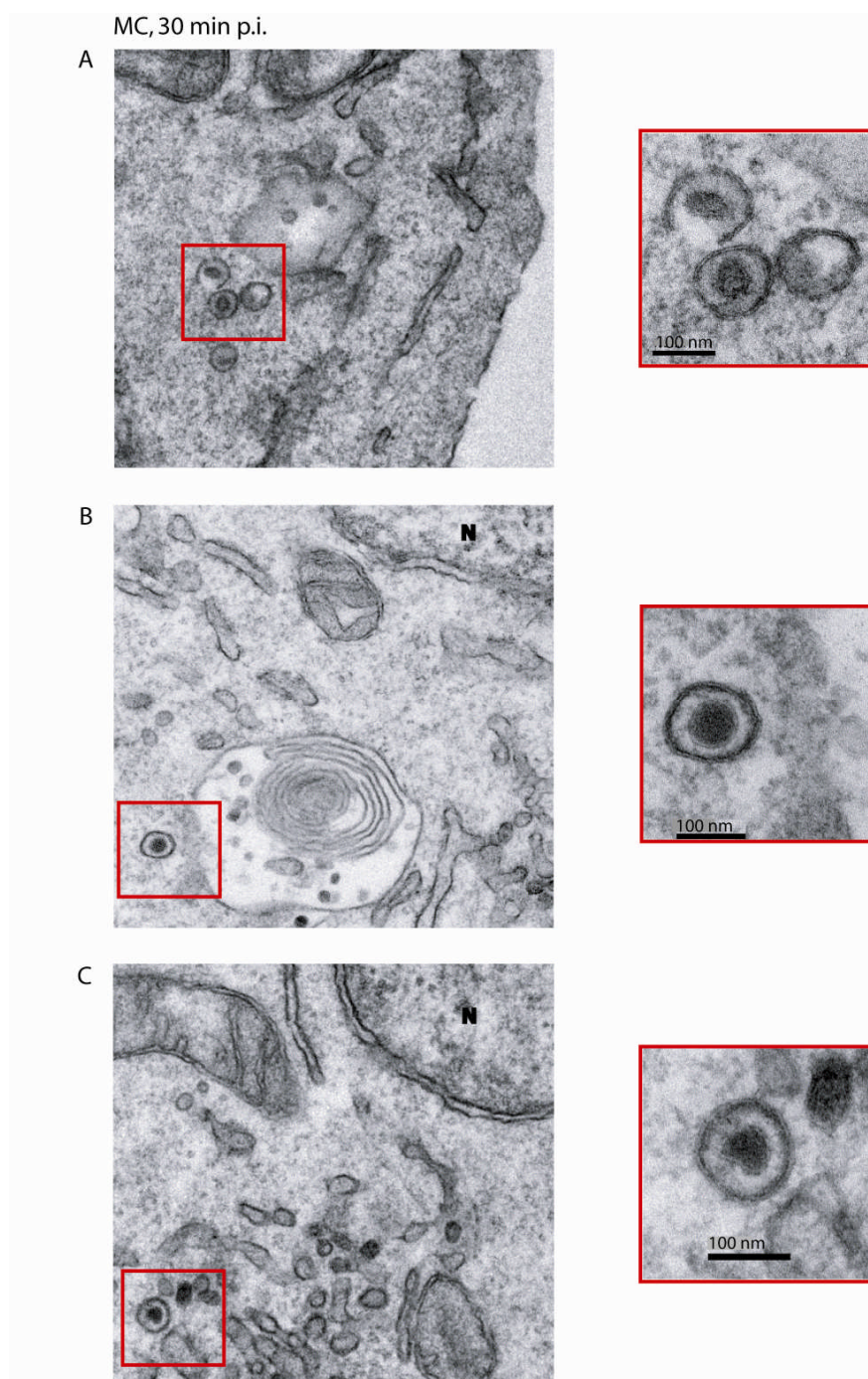
Por otro lado, se analizó el efecto de la infección sobre el CPM2 mediante inmunofluorescencia (**Figura 50**). Para ello, se cultivaron células GFP-MAL2/HOG en MC y se infectaron a una m.d.i.=1. A continuación, se fijaron a las 20 h p.i. y se procesaron para su análisis mediante doble inmunofluorescencia. La detección del virus se llevó a cabo con el anticuerpo anti-gH LP11. Según se observa en la figura 49, la estructura del CPM2 se mantiene inalterada en células infectadas sin que se observe colocalización de la proteína viral gH con dicho compartimento.



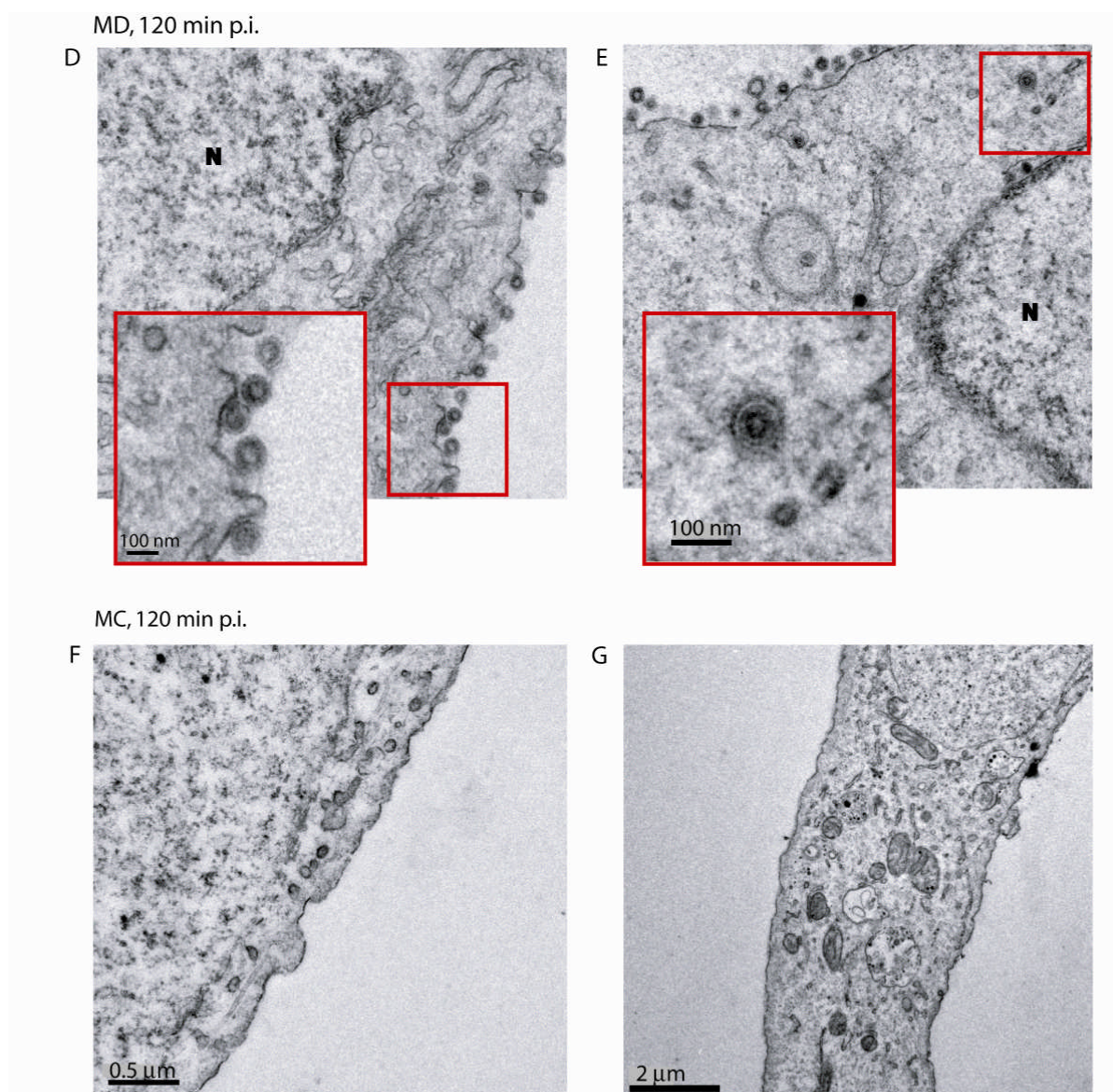
**Figura 50. Efecto de la infección sobre el CPM2.** Las células HOG-MAL2/GFP se cultivaron en MC y se infectaron a una m.d.i.=1. A las 20 h p.i. se fijaron y procesaron para su análisis mediante inmunofluorescencia. La visualización del virus se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-gH LP11.

#### 4.5.2. Estudio de la entrada viral

Una de las opciones estudiadas sobre la diferencia de cinética del ciclo viral en células crecidas en MC o MD fue la posible entrada diferencial del virus en su célula huésped. En una primera aproximación, se realizaron análisis de microscopía electrónica. Para ello, las células HOG cultivadas en MC o MD fueron infectadas a una m.d.i.=100 y fijadas a distintos tiempos p.i. Después, se fijaron y se procesaron mediante inclusión en resina Epon para su posterior análisis.





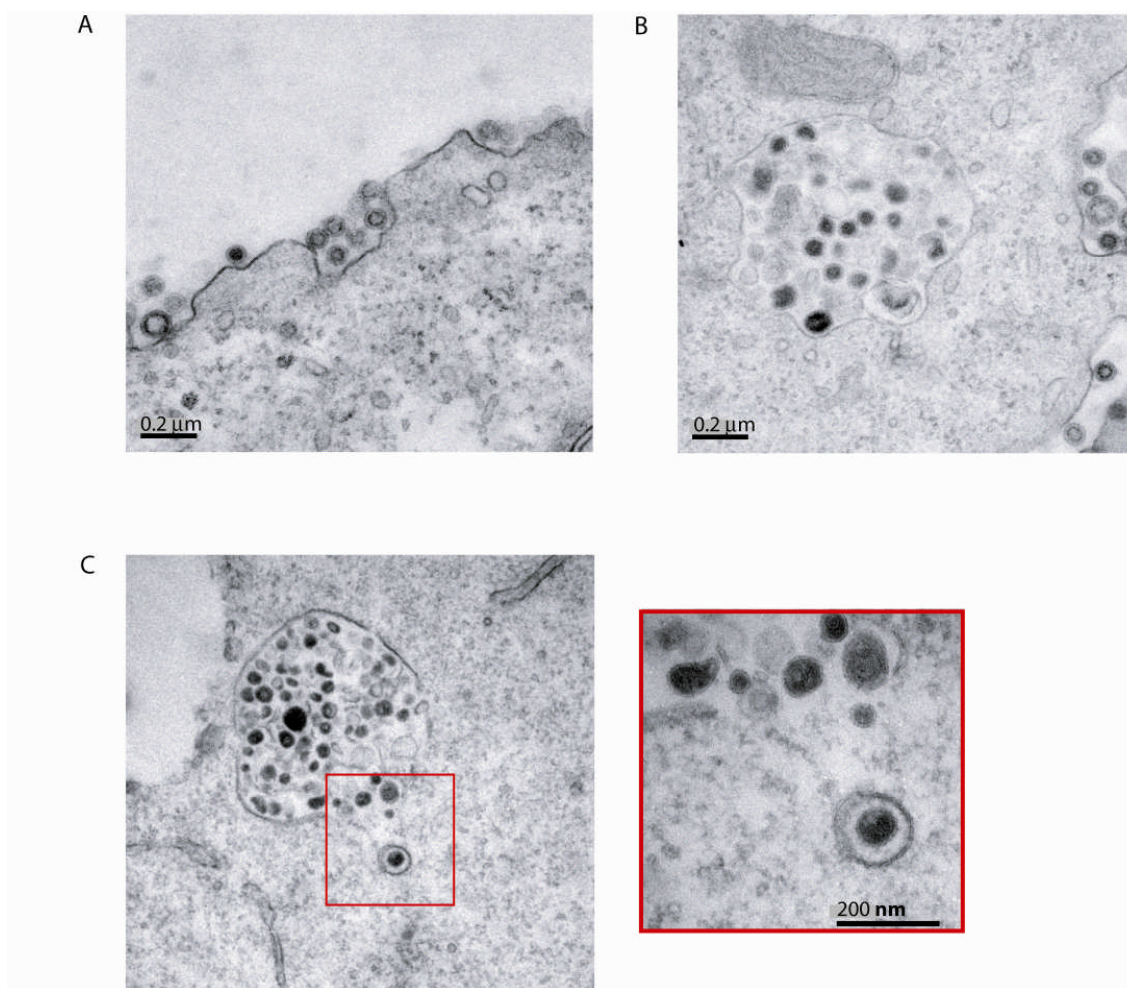


**Figura 51. Estudio de la entrada de HSV-1 en células HOG mediante microscopía electrónica.** Las células cultivadas en MC o MD fueron infectadas a una m.d.i.=100 y fijadas a distintos tiempos según se muestra en la figura. Después, se procesaron para ser analizadas mediante microscopía electrónica. En las células cultivadas en MC y fijadas a los 30 min p.i. se observan viriones intracelulares (A), algunos incluso ya próximos al núcleo (B y C). En las células cultivadas en MD y fijadas a los 120 min p.i. todavía se observan numerosos viriones adheridos a la membrana celular (D) aunque una pequeña proporción ha entrado y se observa algún virión cerca del núcleo (E). Por el contrario, a ese mismo tiempo p.i. no se observan ya viriones en las células cultivadas en MC (F y G).

En las células cultivadas en MC ya se observan viriones intracelulares a los 30 minutos p.i (Figura 51A), algunos incluso ya próximos al núcleo (Figura 51B y C). Sin embargo, en las células diferenciadas, a los 120 minutos p.i. todavía se observaban numerosos viriones

adheridos a la membrana celular (**Figura 51D**), es decir, numerosos viriones que no habían sido todavía capaces de entrar en las células. No obstante, se detectó también una pequeña proporción de viriones intracelulares, algunos cerca del núcleo (**Figura 51E**). Por el contrario, a ese tiempo p.i. no se observaron ya viriones en la células cultivadas en MC (**Figura 51F y G**).

Durante el estudio de la entrada viral, se observó la presencia de viriones en endosomas. Además, se detectaron algunas zonas de la membrana plasmática con invaginaciones conteniendo numerosos viriones (**Figura 52A**), lo que podría corresponder al primer estadio de formación de un endosoma para la entrada viral. Estos endosomas se han observado tanto en células diferenciadas (**Figura 52B**), como en células sin diferenciar (**Figura 52C**). En este último caso, se han visto viriones saliendo de dichos endosomas hacia el citosol.



**Figura 52. Posible entrada de HSV-1 en células HOG mediante endocitosis.** Las células cultivadas en MC o MD fueron infectadas a una m.d.i.=100 y fijadas a distintos tiempos. Después, se procesaron para ser analizadas mediante microscopía electrónica. A y B. Células diferenciadas a las 2 h p.i. Se observa una zona de la membrana plasmática con invaginaciones conteniendo numerosos viriones (A) así como endosomas también

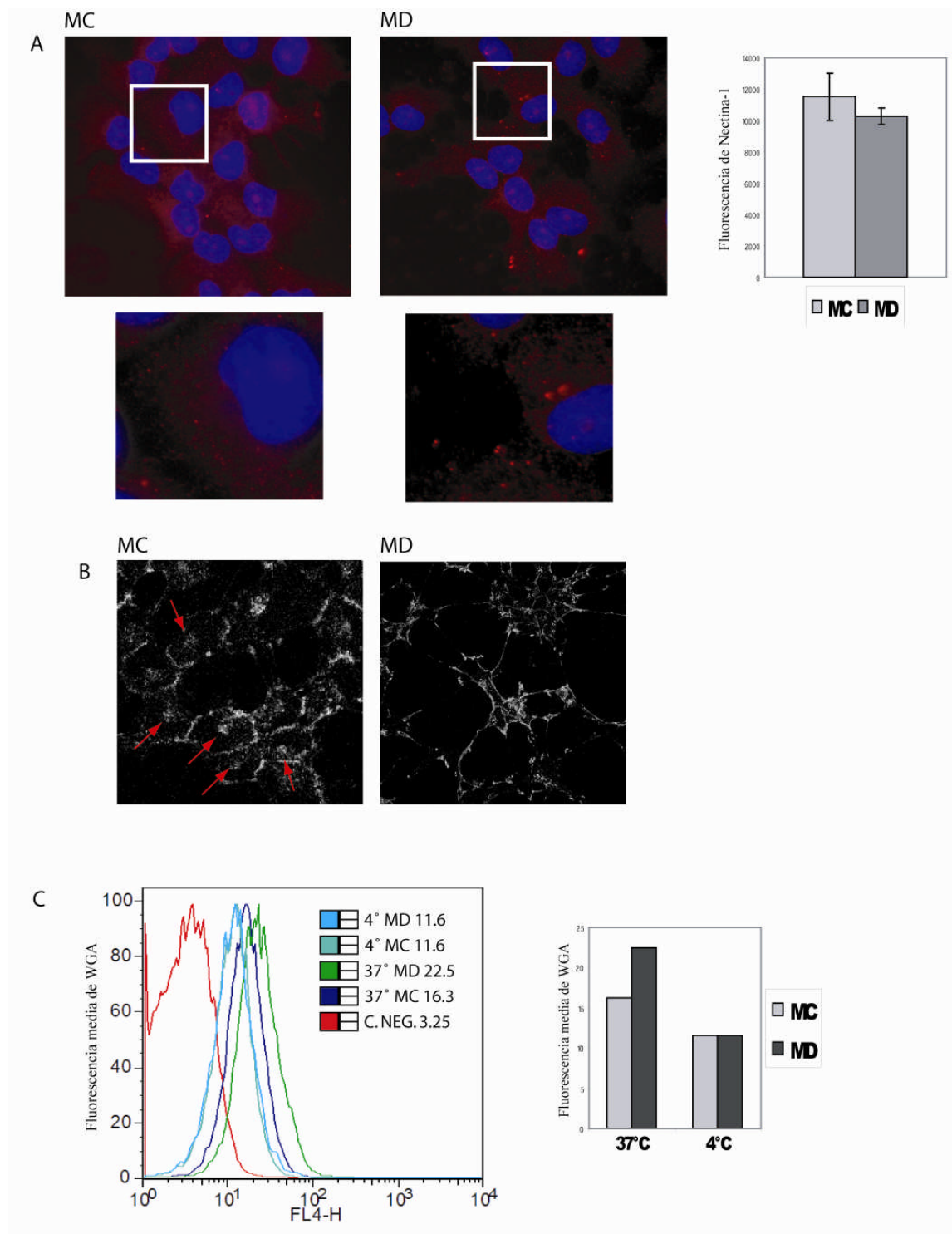
con viriones (B). Células sin diferenciar a los 30 minutos p.i. Se observa un endosoma conteniendo viriones, uno de ellos supuestamente saliendo hacia el citosol.

Una de las posibles causas de las diferencias en la entrada de HSV-1 a la célula podría deberse a los receptores celulares para el virus. Para ello, se analizó la expresión en las células HOG de dos de estos receptores: nectina-1 y HSPGs. El primero se estudió usando un anticuerpo anti-nectina-1, mientras que el segundo se observó con WGA (*wheat germ agglutinin*, aglutinina de germen de trigo) acoplado a Alexa 594 –WGA es una lectina que se une a la n-acetilglucosamina, molécula que forma parte de los HSPGs–.

Para el análisis de nectina-1, las células fueron cultivadas en MC o MD y, a continuación, fijadas y procesadas para su observación mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-nectina-1. Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran una ligera disminución de la fluorescencia de nectina-1 en las células diferenciadas y, además, una redistribución de los receptores, que aparecen formando agrupamientos dispersos (**Figura 53A**). Para el análisis de los HSPGs, las células fueron cultivadas en MC o MD e incubadas a 37°C con WGA durante 10 minutos, tras lo cual fueron fijadas y procesadas para su análisis mediante microscopía confocal. Las imágenes muestran una distribución distinta del receptor según los cultivos. En células diferenciadas se observó un grado elevado de internalización, mientras que en las células no diferenciadas la marca se detectó mayoritariamente en la membrana (**Figura 53B**).

Finalmente, para cuantificar los cambios en la fluorescencia de WGA, independientemente de su localización, se llevaron a cabo estudios mediante citometría de flujo. Para ello, las células fueron cultivadas en MC o MD e incubadas con WGA durante 10 minutos a 37°C, o bien a 4°C para impedir la internalización de la molécula. A continuación, se procesaron para su análisis mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que, a 4°C, es decir, en ausencia de internalización de la molécula, no hay variación en los receptores entre células diferenciadas y sin diferenciar. Por el contrario, a 37°C, se produce un aumento de la fluorescencia en las células diferenciadas, probablemente debido a la tasa de internalización de la molécula (**Figura 53C**).





**Figura 53. Expresión de receptores de HSV-1 en células HOG.** A. Las células fueron cultivadas en MC o MD, tras lo cual fueron fijadas y procesadas para su análisis mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-nectina-1. Las ampliaciones muestran en detalle la redistribución de los receptores en las células diferenciadas, que aparecen formando agrupamientos. Los núcleos se visualizaron con To-Pro-3. B. Las células fueron cultivadas en MC o MD e incubadas a 37°C con WGA durante 10 minutos, tras lo cual fueron fijadas y procesadas para su análisis mediante microscopía confocal. C. Las células fueron cultivadas en MC o MD e

incubadas con WGA durante 10 minutos a 37°C, o bien a 4°C para impedir la internalización de la molécula. A continuación se procesaron para su análisis mediante citometría de flujo. Junto a la leyenda, en colores, se indican los datos de fluorescencia media. Estos mismos resultados se muestran también en un diagrama de barras.



## DISCUSIÓN

---





### 5.1. Infección de OLs con HSV-1: estudios preliminares

Las enfermedades desmielinizantes son los procesos patológicos del SN en los que se produce un daño a la mielina. Las causas pueden ser diversas: genéticas, infecciosas o autoinmunes, entre otras, y en muchos casos, como la EM, siguen siendo desconocidas. Se conocen enfermedades humanas desmielinizantes de origen viral, como la leucoencefalopatía multifocal progresiva, producida por la infección de OLs por el virus JC. Asimismo, hay teorías que apuntan a una implicación vírica en el origen de la EM (Christensen, 2007; Fazakerley y Walker, 2003; Rodríguez-Violante et al., 2009). Por ello, y a pesar de la controversia que genera la etiología de esta enfermedad, es relevante profundizar en la relación que puedan tener los procesos desmielinizantes con agentes virales, para aportar más datos que puedan ir a favor o en contra de la implicación vírica en la etiología de procesos desmielinizantes como la EM.

HSV-1 es un virus neurotrópico que afecta tanto al SNC como al SNP. Además de infectar tejidos epiteliales y establecer latencia en ganglios sensoriales, este virus puede infectar el SNC. Se sabe que HSV-1 puede causar desmielinización multifocal en animales (Kastrukoff et al., 1987) habiéndose constatado la presencia de OLs infectados por HSV-1 en casos de encefalitis aguda (Charpin et al., 1985; Skoldenberg, 1996). Además, existen estudios, todavía preliminares, que sugieren cierta relación entre EM y HSV-1 (Bergstrom et al., 1989; Ferrante et al., 2000; Grau Lopez et al., 2007; Pietropaolo et al., 2005; Sanders et al., 1996; Skorstad et al., 2009). Un estudio sobre el posible papel de los herpesvirus como factores desencadenantes o agravantes en la EM recurrente-remitente encontró ADN y ARNm de HSV-1 en un número significativo de pacientes de EM y no en el grupo control (Ferrante et al., 2000). Además, estudiando la presencia de HSV-1 y HSV-2 en muestras de cerebro *postmortem* de individuos con EM y controles –enfermos de Alzheimer o Parkinson y sujetos sin enfermedades neurológicas–, se encontró que el 46% de los casos de EM y el 28% de los controles eran positivos para HSV. No obstante, la distribución del virus en materia blanca y materia gris era similar, lo que hace más cuestionable la participación del virus en la etiología de la enfermedad (Sanders et al., 1996). Asimismo, se han encontrado títulos elevados de anticuerpos contra HSV-1, aunque también contra otros virus, en el LCR de pacientes de EM (Bergstrom et al., 1989; Skorstad et al., 2009). Otro trabajo reciente describe el análisis de ADN de diversos virus –HSV-1, HSV-2, KSHV, virus BK y JC– en muestras de enfermos de EM recurrente-remitente. Aunque sólo el 29.5% de las muestras de sangre periférica fueron positivas para alguno de los virus estudiados, todas las muestras positivas lo fueron para HSV-1 y KSHV (Pietropaolo et al., 2005).

Pocos trabajos han abordado el estudio *in vitro* de la infección de células formadoras de mielina con HSV-1. De ellos, la mayoría se ha realizado con células de origen murino, siendo escasas las publicaciones que se basen en el estudio de infecciones de OLs humanos. En este sentido, una de las últimas investigaciones realizadas sobre la infección de OLs primarios de origen humano mostró que la resistencia a HSV-1 depende del donante, lo que sugiere que, al igual que sucede en los modelos experimentales, esta resistencia puede estar genéticamente determinada (Kastrukoff y Kim, 2002).

El primer objetivo, por tanto, que se planteó en la presente Tesis fue el estudio *in vitro* de la susceptibilidad de células oligodendrocíticas al virus HSV-1. Los resultados iniciales obtenidos con la línea celular humana KG-1C mostraron que estas células oligodendrogiales son altamente susceptibles a la infección (Bello-Morales et al., 2005). La infección de esta línea se caracterizó por una alta productividad viral –similar a la observada en células control Vero– y una notable progresión del ECP. Tras la infección, tuvo lugar un significativo proceso de inhibición de los ARNm celulares que correlacionaba con la síntesis de proteínas virales. Los análisis de microscopía electrónica mostraron, además, la presencia de acumulaciones de mitocondrias con una estructura condensada –respiratoriamente activa– localizadas cerca de los agrupamientos de partículas virales recién formadas. Aunque la aparición de factorías energéticas como la observada en nuestro trabajo ya había sido descrita previamente en otros modelos virales (Rojo et al., 1998), la migración de mitocondrias en infecciones de virus ADN con ciclo nuclear permanece sin justificación clara.

Otro de los aspectos analizados en infecciones de células del SNC por HSV-1 es su capacidad de modular la muerte celular programada o apoptosis. De hecho, HSV-1 tiene toda una batería de genes implicados en dicha regulación. En la mayoría de los tipos celulares estudiados, HSV-1 es capaz de modular el proceso de apoptosis. Las células inducen este tipo de muerte como respuesta a la infección, ya que reduce la producción viral. Como se acaba de mencionar, evolutivamente, al parecer, el virus ha desarrollado mecanismos inhibitorios o reguladores de apoptosis (Jerome et al., 1999). Inicialmente, HSV-1 induce muerte celular programada a través de la transcripción de los genes inmediatamente tempranos (Sanfilippo et al., 2004). Más tarde, las proteínas de las células infectadas inhiben la apoptosis, presumiblemente para incrementar la productividad viral (Jerome et al., 2001). Por esta razón, cuando la infección se lleva a cabo en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la traducción, el virus no es capaz de inhibir la apoptosis en este sistema (Sanfilippo et al., 2004). Sin embargo, se ha descrito en estudios *in vivo* que, en células neuronales y microglía, HSV-1 no es capaz de inhibir la apoptosis

(Athmanathan et al., 2001; Aurelian, 2005). Por ello, consideramos oportuno comprobar si en nuestro sistema HSV-1 era capaz o no de inhibir dicho suicidio celular. Tras la infección de las células KG-1C, no aparecieron evidencias de condensación de cromatina ni cuerpos apoptóticos y, además, los análisis bioquímicos mostraron la integridad de la proenzima pro-caspasa-3, no detectándose caspasa-3 activa, lo que sugiere que, al menos en este tipo celular oligodendrocítico, no se produce apoptosis.

Otro de los objetivos planteados en nuestro laboratorio y reflejados en el presente trabajo de Tesis incluyó el estudio de la relación del virus con la maquinaria de tráfico celular. El ARE es un compartimento necesario para la generación y el mantenimiento de la polaridad en células epiteliales (Hoekstra et al., 2004) y, en él, las moléculas se clasifican y se envían, o bien al dominio del que proceden –reciclaje– o bien al dominio opuesto –transcitosis– (Maier y Hoekstra, 2003). El SAC (Ihrke et al., 1998; van IJzendoorn y Hoekstra, 1998) es un endosoma descrito por primera vez en hepatocitos (Ihrke et al., 1998) en el que convergen las rutas endocíticas procedentes de los dominios apical y basolateral, y está considerado como el endosoma equivalente al ARE descrito en células hepáticas. Los OLs mielinizantes son células polarizadas y, dado que el ARE/SAC es un endosoma necesario para el mantenimiento de la polaridad y el tráfico de proteínas y lípidos, se consideró oportuno estudiar si HSV-1 estaba relacionado con dicho compartimento en algún momento de su ciclo viral.

MAL2 es una proteína de *rafts* residente en el ARE/SAC y que, como se detallará más adelante, está considerada como un marcador de dicho compartimento. Los estudios preliminares de esta proteína en OLs se llevaron a cabo en nuestro laboratorio con la línea KG-1C. Nuestro estudio mostró por primera vez la expresión de MAL2 en células oligodendrocíticas (Bello-Morales et al., 2005). Además, los análisis preliminares de MAL2 en esta línea revelaron un cierto aumento en su detección tras la infección por HSV-1. Estos resultados sugerirían un aumento de la expresión de dicha proteína. No obstante, una redistribución o exposición de epítomos nuevos inducidos por la infección y observados en el ensayo de inmunofluorescencia que justificaran el aumento de detección, aunque improbable, no puede, en este momento, descartarse.

Intentos posteriores de análisis de esta línea celular mediante la inducción de estados de maduración y diferenciación celular, esenciales para tratar de estudiar un posible papel de la infección en condiciones cercanas a la mielinización, chocaron con la resistencia de la línea celular KG-1C a los medios estándares de diferenciación. Cuando se procedió a cultivar las células en condiciones de diferenciación, encontramos que los distintos medios utilizados para

diferenciar células oligodendrocíticas no produjeron cambios apreciables en los marcadores moleculares ni en su morfología. Por ello, se decidió ampliar el estudio a otras líneas, tanto humanas como de origen murino.

## 5.2. Caracterización de MAL2 en células oligodendrocíticas

Una vez observada la expresión de MAL2 en nuestros estudios preliminares sobre células oligodendrocíticas, el siguiente paso lógico fue la caracterización de esta proteína y las estructuras que la contienen en dicho sistema estudiando, especialmente, la posible existencia de un compartimento análogo al ARE/SAC, endosoma descrito previamente en células epiteliales como ya se ha señalado. Esto nos pareció especialmente relevante, dado que hasta el momento no se había descrito ese compartimento en OLs. De hecho, nuestro estudio describe, por primera vez en células oligodendrocíticas, un compartimento positivo para MAL2 con características similares al descrito en otros tipos celulares (Bello-Morales et al., 2009).

### 5.2.1. Expresión de MAL2 y asociación a *rafts*

MAL2 (Wilson et al., 2001) es una proteína integral de membrana de 19 kDa –30-40 kDa las formas glicosiladas– perteneciente a la familia MAL de proteolípidos, cuya expresión se ha encontrado en varias líneas celulares epiteliales –como HepG2, Caco-2 o MDCK– y en muchos tipos de tejidos humanos (de Marco et al., 2002; Marazuela et al., 2004). Hasta el momento no se había abordado el estudio de MAL2 en células del sistema nervioso, aunque sí se había detectado su expresión en neuronas (Marazuela et al., 2004). Por tanto, la fase siguiente de la investigación consistió en la caracterización de MAL2 en células oligodendrocíticas y la descripción del compartimento positivo para MAL2 (CPM2) en estas células.

La presente Tesis ha mostrado que las líneas oligodendrocíticas estudiadas expresan MAL2, que la expresión aumenta con la diferenciación, y que dicha proteína está localizada en *rafts*. La expresión de MAL2 en las células Oli-neu, modelo murino de OLs inmaduros, aumenta sensiblemente a las pocas horas de comenzar a ser cultivadas en condiciones de diferenciación: 24 horas después de añadir MD, en torno al 80% de las células expresaban cantidades detectables de MAL2. Por tanto, el CPM2 se detecta nada más comenzar el proceso de polarización.

En las células humanas HOG, por el contrario, el CPM2 se detectó directamente en células cultivadas en MC, previamente a la inducción del proceso de diferenciación análogo al descrito para los cultivos murinos. Este hecho puede deberse al distinto estadio de desarrollo que tienen ambas líneas: las células Oli-neu son OPCs, con características, por tanto, de células precursoras, mientras que las células HOG son células más avanzadas en el desarrollo, que expresan –cuando se cultivan en condiciones de crecimiento– marcadores de OLs inmaduros como GalC y CNPasa. Algunos estudios han mostrado que, aunque el cultivo de estas células en MD induce cierta diferenciación, que se reconoce por la aparición de las prolongaciones citoplásmicas típicas de OLs o procesos y el aumento de la expresión de MBP y MOG, no se encuentran diferencias significativas en la expresión de GalC y CNPasa entre las células HOG cultivadas en MD en comparación con cultivos en MC (Buntinx et al., 2003).

En relación con el aislamiento de *rafts*, los primeros experimentos de extracción de mielina con detergentes, realizada con 1% de Triton X-100, mostraron la solubilización de las principales proteínas de mielina (Kim y Pfeiffer, 1999; Kramer et al., 1997; Pereyra et al., 1988), lo cual indujo a dudar de la asociación de estas proteínas de mielina con las balsas lipídicas. Sin embargo, cuando los experimentos se realizaron con CHAPS, las principales proteínas de mielina –PLP/DM20, MAG y MOG– se recuperaron casi exclusivamente de la fracción resistente al detergente (Simons et al., 2000). En este sentido, nuestros resultados muestran la presencia de MAL2 exógeno en la fracción insoluble de las células tratadas con CHAPS, lo que sugiere su asociación a balsas lipídicas.

### 5.2.2. Características del CPM2

En hepatocitos HepG2, MAL2 se encontró en un compartimento endosomal subapical localizado debajo del citoesqueleto de actina canalicular (de Marco et al., 2006). Este compartimento positivo para MAL2 se identificó posteriormente como el compartimento subapical o SAC. Por tanto, se ha sugerido que MAL2 reside mayoritariamente en el ARE/SAC, aunque también se detecta, en menor medida, en el CE. Además, MAL2 es necesaria para la ruta de transporte indirecto, ya que la reducción de sus niveles bloquea la transcitosis del complejo pIgR-IgA y la proteína CD59 (de Marco et al., 2002). La reducción de MAL2 no afecta a la internalización de estas moléculas ni a su llegada a los BEEs, sino a su salida del CE y, por tanto, a su llegada al ARE/SAC. Además, la IgA acumulada en estas condiciones de reducción de MAL2 colocaliza con la Tf internalizada, lo que reafirma su presencia en el CE.

Para comprobar si el CPM2 en OLs compartía propiedades similares con las descritas para las células epiteliales, se estudiaron algunas características comunes que identifican al ARE/SAC. El compartimento subapical positivo para MAL2 de los hepatocitos HepG2 se ha descrito como un compartimento sensible a nocodazol, Rab11a+, IgA+, desprovisto de Tf internalizada y formado por elementos tubulovesiculares y pequeñas vesículas en forma de copa.

Los análisis de inmunofluorescencia confocal realizados con la línea celular Oli-neu revelaron que MAL2 se localizaba de manera predominante en un compartimento pericentrosomal, dependiente de microtúbulos y positivo para Rab11a, como se ha observado en células epiteliales. Hay que señalar que la colocalización es sólo parcial, lo cual estará probablemente debido a la subcompartimentalización del ARE/SAC (van IJendoorn y Hoekstra, 1999).

Un inconveniente en el estudio de MAL2 fue el bajo nivel de expresión de esta proteína. Para mejorar la detección y posibilitar ulteriores experimentos, se transfectó establemente la línea HOG con GFP-MAL2, una construcción formada por GFP unida al extremo amino-terminal de MAL2. Esta construcción ya se ha utilizado previamente en hepatocitos HepG2, demostrándose que la presencia de la porción GFP ni interfiere con la asociación de MAL2 a *rafts* ni impide su glicosilación (de Marco et al., 2006). Además, en ese mismo estudio se ha comparado la distribución de MAL2 endógeno con la de GFP-MAL2, mostrando que, al igual que ocurre con MAL2, GFP-MAL2 se encuentra también distribuido debajo del citoesqueleto de actina canalicular. Por ello, esta construcción ha demostrado ser una herramienta útil en el estudio de MAL2 en hepatocitos.

Las características del CPM2 de las células HOG transfectadas son similares a las observadas para la proteína MAL2 endógena de la línea Oli-neu: distribución pericentrosomal, colocalización con Rab11a, morfología tubulovesicular y sensibilidad al nocodazol. Las imágenes confocales mostraron colocalización entre el marcador de ARE/SAC Rab11 y GFP-MAL2. Además y al igual que ocurre en células HepG2, esta colocalización se produce fundamentalmente en la zona pericentrosomal, no en las tubulovesículas positivas para MAL2 dispersas por el citoplasma.

### 5.2.3. Ensayos de transcitosis

CD59 es una molécula anclada a GPI que es endocitada y transportada al dominio apical mediante transporte indirecto. El análisis simultáneo del movimiento de MAL2 y CD59 ha

aportado valiosos datos del mecanismo mediante el cual MAL2 interviene en el proceso de transcitosis. Según han descrito estudios recientes en células HepG2 (de Marco et al., 2006), durante la transcitosis, CD59, tras endocitarse basolateralmente, se acumula en agrupamientos vesiculares que son accesibles al receptor de Tf internalizada y que contienen bajos niveles de MAL2. A continuación, se produce un proceso de clasificación, y el receptor de Tf se traslada a otras vesículas, mientras que el contenido de MAL2 y CD59 va aumentando progresivamente en esos agrupamientos. Simultáneamente, estas vesículas ricas en MAL2 y CD59, se van acumulando gradualmente en una estructura globular que se fusiona con el SAC, depositándose finalmente la carga en la superficie apical mediante extensiones tubulares que emergen de este compartimento. En nuestros experimentos, GFP-MAL2 también se distribuye mayoritariamente en una estructura pericentrosomal que colocaliza con CD59. Se han detectado asimismo vesículas dispersas por el citoplasma positivas para GFP-MAL2 y CD59, así como otras positivas para CD59 pero no para GFP-MAL2.

También en algunas células se ha encontrado una estructura globular no pericentrosomal positiva para GFP-MAL2 y CD59 que podría corresponder a la llamada “estructura globular” descrita en células HepG2 (de Marco et al., 2006). Igualmente, se ha observado una estructura en forma de retículo tubular dirigido hacia los procesos que parece surgir del CPM2 pericentrosomal y que no colocaliza con la red de microtúbulos. Este retículo tubular no se detecta en células cultivadas a 18°C, pero aparece de nuevo cuando la temperatura sube a 37°C, lo que parece sugerir que dicha estructura pudiera estar relacionada con los estadios finales del tránsito de MAL2 desde el CPM2 hasta la superficie apical –o su equivalente en OLs no mielinizantes–.

En otros sistemas se han observado estructuras semejantes: durante las etapas finales del transporte de CD59 a la membrana apical en hepatocitos HepG2, se detectaron redes tubulares que conectaban la llamada “estructura globular” con el compartimento subcanalicular y la membrana canalicular (de Marco et al., 2006). Otros estudios han descrito también un retículo tubulovesicular que representa un aparato endocítico conectado al ARE/SAC (Marbet et al., 2006).

Mientras que, cuando se analiza en estado estático, MAL2 se localiza principalmente en el ARE/SAC, esta proteína está también presente –aunque en menor cantidad– en endosomas perinucleares accesibles a Tf, lo que en células polarizadas se conoce como CE. Además, muchas de las características del ARE/SAC son compartidas también por el CE. En nuestros

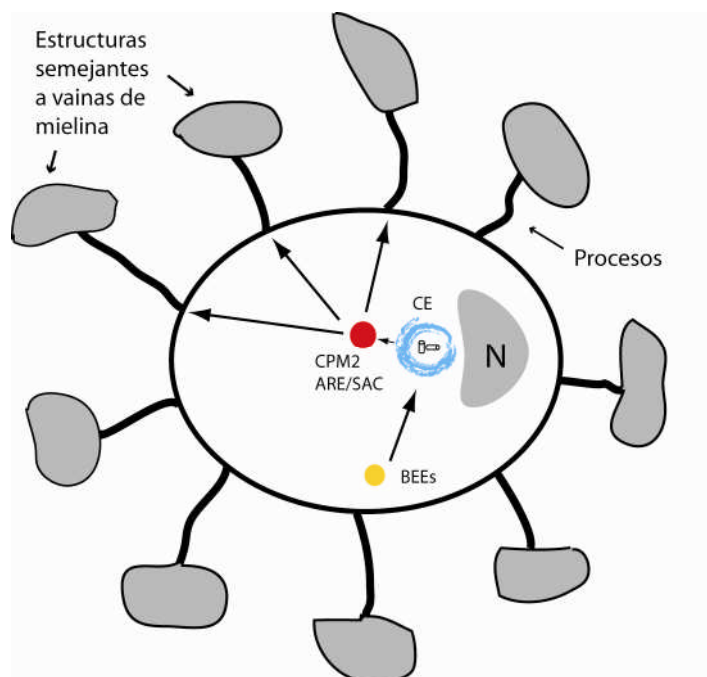
experimentos se hizo, por tanto, necesario encontrar alguna característica diferencial que permitiera distinguir ambos compartimentos. La distinta distribución de Tf en la célula permitió esta diferenciación. Por tanto, para discriminar esas dos estructuras –ARE/SAC y CE– y a la vez mejorar las condiciones de colocación de MAL2 y CD59, se analizó a 18°C el tráfico y la acumulación de CD59 –molécula que alcanza la superficie apical vía ARE/SAC y se acumula en él a 18°C– y Tf –que se acumula en el CE y no alcanza el ARE/SAC–. Se ha probado que esta temperatura evita la salida de carga del ARE/SAC en otros sistemas (Apodaca et al., 1994; van IJzendoorn y Hoekstra, 1998). Para ello las células GFP/MAL2 HOG se incubaron con un anticuerpo anti-CD59 y Tf a 18°. Los resultados mostraron que la Tf internalizada alcanzaba un compartimento pericentrosomal –probablemente el CE–, pero estaba ausente en un endosoma situado junto a él que sí acumulaba, sin embargo, CD59 y MAL2 –el compartimento que correspondería al ARE/SAC–.

Para comprobar si las células cultivadas en MD adquirirían un fenotipo polarizado, se analizó la distribución de CD59 –una molécula de distribución apical– y Tf –molécula de distribución basolateral–. Para ello, las células GFP-MAL2/HOG se incubaron con un anticuerpo anti-CD59 y Tf a 18°C, y a continuación se elevó la temperatura a 37°C durante 30 minutos para permitir el avance de las moléculas. Los resultados mostraron que CD59, tras haberse acumulado en el ARE/SAC, se dirige y se acumula en los procesos y en las estructuras semejantes a vainas de mielina, que corresponderían al dominio apical. Por el contrario, Tf, que es escasa en los procesos, se distribuye mayoritariamente en la membrana plasmática, que equivaldría al dominio basolateral.

Esta segregación de las moléculas apicales y basolaterales en dominios distintos sugiere un proceso de polarización celular, lo que sugiere que nuestro sistema celular sería apropiado para realizar estudios de polarización en células oligodendrocíticas, siendo la membrana plasmática equivalente al dominio basolateral y las estructuras semejantes a vainas de mielina, equivalentes al dominio apical.

En resumen, los resultados sugieren que, en células oligodendrocíticas, el CPM2, una estructura pericentrosomal, positiva para Rab11a, dependiente de microtúbulos, que acumula CD59 a 18°C y que carece de Tf internalizada, es un endosoma análogo al ARE/SAC descrito en células epiteliales polarizadas. En la **Figura 54** se muestra esquemáticamente la función sugerida de MAL2 en OLs.





**Figura 54. Esquema representativo de la función sugerida de MAL2 en OLS.** Durante la transcitosis, las moléculas son endocitadas hasta los BEEs. Desde allí llegan al CE pericentrosomal, paso que depende de microtúbulos. De ese endosoma, MAL2 retira la carga –las moléculas que están siendo transportadas– con destino al CPM2 –compartimento análogo al ARE/SAC–. Desde dicho endosoma, las moléculas carga son enviadas a sus destinos apicales –los procesos y las estructuras semejantes a vainas de mielina– mediante una red tubular.

#### 5.2.4. Exosomas

Los exosomas son pequeñas vesículas intraluminales, de entre 30 y 100 nm, secretadas por las células tras la fusión de MVBs que las contienen con la membrana plasmática (Lakkaraju y Rodriguez-Boulan, 2008). Se han encontrado *in vivo* en fluidos corporales como sangre, orina, líquido amniótico, ascites malignos, líquido de lavado broncoalveolar, líquido sinovial o leche materna (Simpson et al., 2008).

Las funciones biológicas de los exosomas están siendo todavía discutidas por la comunidad científica, pero parece claro que pueden servir para eliminar proteínas celulares innecesarias –por ejemplo durante la maduración de los reticulocitos– y actuar como mensajeros intercelulares, ya que se fusionan fácilmente con las células vecinas (Hegmans et al., 2008). Además, algunas moléculas se liberan al medio extracelular a través de su asociación con balsas

lipídicas presentes en la membrana de los exosomas (de Gassart et al., 2003). Se sabe que los OLs secretan al medio exosomas –que contienen PLP y CNP– que parecen balancear la producción de proteínas de mielina (Kramer et al., 2007).

Este trabajo ha mostrado que los OLs poseen gran cantidad de MVBs con vesículas intraluminales positivas para GFP-MAL2, algunos de los cuales podrían estar fusionándose con la membrana plasmática para dar lugar a exosomas. No obstante, el marcaje con CD63, utilizado ampliamente como marcador de exosomas, no ha mostrado colocalización con estos MVBs. Serán necesarios, por tanto, nuevos y futuros análisis para determinar la naturaleza y función de estas estructuras.

### 5.3. Infección de líneas oligodendrocíticas con HSV-1

#### 5.3.1. Efecto de la diferenciación celular

Dado que los medios utilizados para diferenciar células oligodendrocíticas no produjeron cambios apreciables en los marcadores moleculares ni en la morfología de las células KG-1C, los estudios posteriores de infección de HSV-1 y el efecto de la diferenciación celular se realizaron con la línea celular humana HOG y murina Oli-neu, que ya habían demostrado su capacidad para diferenciarse *in vitro* con los medios de cultivo adecuados. Los estudios comparativos con las células Vero, una línea celular cuya infección con HSV-1 está descrita en profundidad, mostraron que las líneas celulares HOG y GFP-MAL2/HOG tenían una productividad viral comparable a la de la línea control. Las células Oli-neu, sin embargo mostraron una productividad viral muy inferior a la de las otras líneas, lo cual era de esperar, al tratarse de un sistema murino.

El estudio comparativo de la infección en células diferenciadas y sin diferenciar mostró que en el primer caso, la infección parece estar retrasada con respecto a las células más inmaduras, no tratadas con medio de diferenciación. Estos resultados parecen estar apoyados por los estudios realizados con células MDCK, en los que HSV-1 infecta preferentemente la superficie basolateral (Marozin et al., 2004). Dichos trabajos muestran que las células MDCK y Caco-2 polarizadas no eran susceptibles a la infección apical con HSV-1, aunque sí lo eran si el virus accedía a las células desde la cara basolateral, o si la disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular debilitaba las uniones célula-célula –hay que recordar que nectina-1 colocaliza principalmente con la proteína de adhesión celular dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  E-cadherina, en las uniones adherentes–. De

hecho, muchos autores piensan que la colocalización de las nectinas con las uniones adherentes puede explicar que la infección de los virus que se extienden desde las neuronas a las células epiteliales tenga lugar desde el dominio basolateral. Además, la disgregación de las uniones estrechas provoca una redistribución de las nectinas por toda la superficie celular que desemboca en una mayor susceptibilidad al virus (Mestecky et al., 2005). Sorprendentemente, estudios realizados con otras líneas celulares epiteliales polarizadas –ECC-1, CaCo-2 y ARPE-19– parecen indicar lo contrario, sugiriendo que la entrada de HSV-1 se produce preferentemente a través del dominio apical, mientras que la entrada por el dominio basolateral está dificultada (Galen et al., 2006). Además, la susceptibilidad a la infección en la superficie apical está, en dichos estudios, ligada a la expresión de nectina-1, que se distribuye mayoritariamente en el dominio apical de las células epiteliales estudiadas.

En resumen, estos trabajos muestran que en líneas celulares epiteliales polarizadas, nectina-1 juega un papel fundamental en la entrada de HSV-1. Además, en estudios realizados con tejidos nerviosos humanos normales y neoplásicos, se ha constatado la expresión de este receptor en OLs (Guzman et al., 2006). Nuestros resultados muestran también la expresión de nectina-1 en los sistemas oligodendrocíticos utilizados, siendo, por tanto, muy probable que ésta esté funcionando como receptor de HSV-1. En nuestro caso, por consiguiente, sería lógico pensar que la diferenciación y la polarización celular puedan estar afectando a la distribución de nectina-1, alterando, de esa manera, la susceptibilidad a HSV-1.

### 5.3.2. Entrada viral

Como se acaba de sugerir, una de las posibilidades que justificarían el retraso en la infección de células oligodendrocíticas diferenciadas, habría que buscarla en la unión de HSV-1 a su receptor celular y subsiguiente adsorción y entrada. Entre las múltiples aproximaciones a dicho estudio, nos decantamos, en primer lugar, por la observación directa mediante microscopía electrónica –sin descartar próximos ensayos de inmunofluorescencia y bloqueo mediante anticuerpos específicos–. Mediante dicha técnica se pudieron observar, en las células diferenciadas, numerosos viriones adheridos a la membrana celular –es decir, viriones que no habían sido todavía capaces de entrar en las células– a las 2 h p.i., mientras que en las células no diferenciadas, apenas se detectó unión de viriones a la superficie celular, sugiriendo un estadio de infección más avanzado –sobre todo teniendo en cuenta los datos sobre ECP y producción viral–.

Durante el estudio de la entrada viral, se observó la presencia de viriones en endosomas, tanto en células diferenciadas, como en controles en MC, aunque por el momento desconocemos el significado último de esta vía de entrada y futuros abordajes dilucidarán si es un proceso diferencial entre las diferentes líneas celulares y sus estados de maduración. Por otra parte, varios trabajos han mostrado que el secuestro de patógenos intracelulares durante la autofagia no se limita a bacterias y a parásitos, sino que también se pueden capturar viriones mediante procesos autofágicos (Levine y Deretic, 2007).

En el caso de HSV-1, se ha constatado la presencia de nucleocápsidas virales englobadas por autofagosomas cuando éstas salen del núcleo al citoplasma (Talloczy et al., 2006), aunque por el momento no se sabe si la autofagia participa también en el secuestro de viriones durante su entrada a la célula. Por ello, en nuestro caso, habría que estudiar si los endosomas que hemos observado dan lugar o no a infección productiva, ya que podría tratarse de autofagosomas. No obstante, en células cultivadas en MC se detectaron viriones saliendo desde endosomas hacia el citosol, lo cual, en principio, descartaría esta última hipótesis.

Estas observaciones en células oligodendroclíticas abren vías de estudio interesantes, ya que los procesos autofágicos pueden tener una enorme importancia durante la patogénesis: trabajos recientes realizados con sistemas neuronales han mostrado que HSV-1 codifica una proteína, ICP34.5 que, si se une a la proteína celular Beclin 1, inhibe su función autofágica (Mizushima et al., 2008; Orvedahl et al., 2007). Estos trabajos sugieren que la inhibición de la autofagia podría ser un mecanismo molecular mediante el cual los virus evaden la inmunidad innata causando procesos patológicos fatales (Orvedahl et al., 2007).

Por supuesto, una de las causas principales de las diferencias en la entrada de HSV-1 en los distintos sistemas de análisis, podría imputarse a los receptores celulares para el virus. Para dilucidar esta opción, se analizó la expresión de dos de estos receptores posibles para el virus: nectina-1 y HSPGs, utilizando un anticuerpo anti-nectina-1 y WGA, respectivamente. Los resultados mostraron una ligera disminución de la fluorescencia de nectina-1 en las células diferenciadas y, además, una redistribución de los receptores, en forma de agrupamientos donde se concentraba la señal. Esta disminución y redistribución de los receptores podría ser la causa de la alteración en la entrada viral. Por el contrario, los resultados de los análisis de WGA, el marcador de HSPGs, no mostraron diferencias significativas entre células tratadas o no con MD, ya que, probablemente, el aumento de la fluorescencia observado en las células diferenciadas cuando se incubaba la lectina a 37°C, se deba a la internalización de la molécula.

### 5.3.3. Relación del virus con MAL2 y el CPM2

Los OLs mielinizantes son células polarizadas y, dado que el ARE/SAC es un endosoma necesario para el mantenimiento de la polaridad celular, se consideró relevante estudiar si HSV-1 estaba relacionado con dicho compartimento. Por ello, otro objetivo fundamental de esta Tesis consistió en estudiar si HSV-1 se relacionaba con el CPM2 –el compartimento equivalente al ARE/SAC de las células epiteliales– en algún momento de su ciclo viral. Los resultados mostraron que la estructura del CPM2 se mantuvo intacta en células infectadas, sin observar colocalización del virus con dicho compartimento. Sí se detectó un ligero aumento de MAL2 en las células infectadas, tal y como ya se había observado, y comentado, durante la infección de la línea celular KG-1C. De hecho, se ha visto que la infección aumenta ligeramente la expresión de O1, un marcador de diferenciación de OLs.

En este sentido, numerosos trabajos han mostrado cómo ciertos virus son capaces de dirigir cambios en la morfología celular e inducir procesos de diferenciación. Por ejemplo, el virus vaccinia y otros poxvirus codifican genes que inducen polimerización de la actina, migración celular, formación de proyecciones celulares y cambios en los mecanismos de adhesión celular (Sanderson y Smith, 1999). Asimismo, células epiteliales transfectadas con ciertos genes del virus del papiloma humano (HPV) adquieren un fenotipo diferenciado (Yankaskas et al., 1993). También, la proteína x del virus de la hepatitis B (HBx) induce un fenotipo migratorio acompañado por la polarización de ciertas moléculas de adhesión celular (Lara-Pezzi et al., 2001). Otro caso de inducción de diferenciación celular lo constituye el gen vpr de VIH, cuya capacidad para inducir diferenciación se ha constatado en la línea celular TE671 (Levy et al., 1993). Por ello, la idea de una posible inducción de HSV-1 de la diferenciación celular se nos antoja atractiva y merecedora de futuros análisis.

### 5.4. Sistemas celulares

Para poder extrapolar los resultados obtenidos en líneas celulares a sistemas más fisiológicos, nos resulta evidente que es vital especular sobre la idoneidad y validez del sistema elegido para el presente trabajo. Por ello, un aspecto importante para el desarrollo de la presente Tesis consistió en la elección del sistema celular. Las líneas celulares oligodendrocíticas inmortalizadas han sido utilizadas con éxito y han demostrado su capacidad para reconocer axones (Trotter, 1993). No obstante, en nuestro trabajo consideramos conveniente justificar el uso de los sistemas celulares que pretenden reproducir el funcionamiento de las células del SN. Las líneas celulares HOG y Oli-neu han sido ampliamente utilizadas como modelos

oligodendrocíticos, dadas sus características morfológicas y fisiológicas. La línea humana HOG posee características de OLs inmaduros, como la expresión de GalC y CNPasa. Cuando se cultiva en MD aumenta la expresión de MBP y MOG (Buntinx et al., 2003; de Arriba Zerpa et al., 2000) y se produce la aparición de numerosos procesos. Oli-neu (Jung et al., 1995) es una línea murina de células O-2A inmortalizada con el oncogen *neu* –también llamado HER-2 o c-erbB-2–. Este oncogen presenta una alta homología con el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), y se diferencia de su proto-oncogén en una mutación en su dominio transmembrana que produce una activación constitutiva de la actividad tirosina quinasa, la cual aumenta más de 100 veces produciendo por ello efectos oncogénicos. La línea Oli-neu es, resumiendo, una línea de OPCs cuyo cultivo con dbcAMP produce un aumento de los marcadores de diferenciación O1 y MAG.

El presente trabajo muestra cómo las líneas celulares HOG y Oli-neu cultivadas en MD adquieren unas características morfológicas compatibles con la morfología de los OLs diferenciados: halo perinuclear, soma celular redondeado y aparición de procesos ramificados que se extienden desde el pericarion. Además, se ha observado la aparición de estructuras semejantes a vainas de mielina (*myelin-like membrane sheets*). Estas estructuras se han descrito en numerosos estudios con cultivos primarios y mixtos (Bansal y Pfeiffer, 1994; Dubois-Dalcq et al., 1986; Gard y Pfeiffer, 1989; Hayashi y Su, 2004; Schneider et al., 2005). Además, esas estructuras semejantes a mielina acumulaban MAL –una de las principales proteínas de mielina– y la proteína apical CD59.

En ese mismo sentido también pudimos comprobar que en las células GFP-MAL2/HOG cultivadas en MD, CD59 y Tf segregaban en distintos dominios celulares cuando transitaban por la célula. Así, Tf se acumuló mayoritariamente en la membrana celular, –que correspondería a la superficie basolateral– tras pasar por el CE, mientras que CD59 se acumuló mayoritariamente en los procesos y las estructuras semejantes a vainas de mielina –que equivaldrían a la superficie apical– tras su paso por el CPM2. Esta segregación sugiere un fenotipo en estado de polarización y, por tanto, sugiere que esta línea celular es adecuada para realizar estudios de polarización en células oligodendrocíticas.

## CONCLUSIONES

---





## 6. CONCLUSIONES

1. Las líneas oligodendrocíticas humanas estudiadas son altamente susceptibles a la infección por HSV-1, mostrando la línea murina Oli-neu una clara inhibición inicial de la entrada viral.
2. En estas líneas celulares, MAL2 reside en balsas lipídicas y su expresión aumenta con la diferenciación.
3. El compartimento positivo para MAL2 muestra características comunes con el ARE/SAC descrito en células epiteliales polarizadas, como localización pericentrosomal, morfología tubulovesicular, expresión de Rab11a, acumulación de CD59 a 18°C, sensibilidad a la disgregación de microtúbulos y carencia de Tf internalizada. Por ello se sugiere que este CPM2 es un compartimento análogo al ARE/SAC.
4. La infección por HSV-1 no altera significativamente el CPM2 en OLs, aunque sí produce un aumento en la expresión de MAL2. Dado que dicha infección también parece aumentar la expresión de O1, marcador de diferenciación, se sugiere que HSV-1 podría inducir, en alguna medida, el proceso de diferenciación, lo que justificaría el aumento de MAL2.
5. La diferenciación de OLs retrasa la infección de HSV-1. Esto puede ser debido a que, en células diferenciadas, la entrada de HSV-1 estaría dificultada. En este sentido, la expresión de nectina-1, un receptor de HSV-1, disminuye con la diferenciación y experimenta una redistribución en la membrana.

Estudios futuros tendrán que profundizar en los siguientes aspectos que quedan aún por dilucidar:

- La relación entre los cambios observados de los receptores para HSV en células diferenciadas y su posible papel en la adsorción y entrada viral
- El papel de la endocitosis en la entrada del virus en células diferenciadas y sin diferenciar
- La posible inducción de autofagosomas
- La estructura y función de los MVBs hallados en las líneas estudiadas y la posible producción de exosomas

Finalmente, señalar que es de enorme interés continuar con el estudio del CPM2 y su relación

con el transporte de proteínas de mielina y la mielinización, aspecto que ningún estudio ha abordado hasta el momento. Además, habría que extender estos estudios a otros sistemas celulares, especialmente cultivos primarios y co-cultivos con neuronas.

## REFERENCIAS

---



## 7. REFERENCIAS

- Ajuh, P., Chusainow, J., Ryder, U., Lamond, A.I., 2002. A novel function for human factor C1 (HCF-1), a host protein required for herpes simplex virus infection, in pre-mRNA splicing. *Embo J* 21, 6590-6602.
- Alonso, M.A., Millan, J., 2001. The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci* 114, 3957-3965.
- Alonso, M.A., Weissman, S.M., 1987. cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1997-2001.
- Apodaca, G., Katz, L.A., Mostov, K.E., 1994. Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes. *J Cell Biol* 125, 67-86.
- Aschner, M., Allen, J.W., Kimelberg, H.K., LoPachin, R.M., Streit, W.J., 1999. Glial cells in neurotoxicity development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 151-173.
- Athmanathan, S., Vydehi, B.V., Sundaram, C., Vemuganti, G.K., Murthy, J.M., 2001. Neuronal apoptosis in herpes simplex virus - 1 Encephalitis (HSE). *Indian J Med Microbiol* 19, 127-131.
- Aurelian, L., 2005. HSV-induced apoptosis in herpes encephalitis. *Curr Top Microbiol Immunol* 289, 79-111.
- Banki, K., Colombo, E., Sia, F., Halladay, D., Mattson, D.H., Tatum, A.H., Massa, P.T., Phillips, P.E., Perl, A., 1994. Oligodendrocyte-specific expression and autoantigenicity of transaldolase in multiple sclerosis. *J Exp Med* 180, 1649-1663.
- Bansal, R., Pfeiffer, S.E., 1994. Inhibition of protein and lipid sulfation in oligodendrocytes blocks biological responses to FGF-2 and retards cytoarchitectural maturation, but not developmental lineage progression. *Dev Biol* 162, 511-524.
- Baringer, J.R., 2008. Herpes simplex infections of the nervous system. *Neurol Clin* 26, 657-674, viii.
- Barnett, M.H., Prineas, J.W., 2004. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 55, 458-468.
- Barnett, M.H., Sutton, I., 2006. The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift. *Curr Opin Neurol* 19, 242-247.
- Barzilai, A., Zivony-Elbom, I., Sarid, R., Noah, E., Frenkel, N., 2006. The herpes simplex virus type 1 vhs-UL41 gene secures viral replication by temporarily evading apoptotic cellular response to infection: Vhs-UL41 activity might require interactions with elements of cellular mRNA degradation machinery. *J Virol* 80, 505-513.
- Baumann, N., Pham-Dinh, D., 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81, 871-927.
- Bello-Morales, R., De Marco, M.C., Aranda, J.F., Matesanz, F., Alcina, A., Lopez-Guerrero, J.A., 2009. Characterization of the MAL2 positive compartment in oligodendrocytes. *Exp Cell Research* DOI:10.1016/j.yexcr.2009.08.003
- Bello-Morales, R., Fedetz, M., Alcina, A., Tabares, E., Lopez-Guerrero, J.A., 2005. High susceptibility of a human oligodendroglial cell line to herpes simplex type 1 infection. *J Neurovirol* 11, 190-198.
- Bender, F.C., Whitbeck, J.C., Ponce de Leon, M., Lou, H., Eisenberg, R.J., Cohen,

- G.H., 2003. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J Virol* 77, 9542-9552.
- Bergstrom, T., Andersen, O., Vahlne, A., 1989. Isolation of herpes simplex virus type 1 during first attack of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 26, 283-285.
- Berry, M., Hubbard, P., Butt, A.M., 2002. Cytology and lineage of NG2-positive glia. *J Neurocytol* 31, 457-467.
- Boison, D., Stoffel, W., 1994. Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11709-11713.
- Bowman, C.L., Kimelberg, H.K., 1984. Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature* 311, 656-659.
- Bribian, A., de Castro, F., 2007. [Oligodendrocytes: their embryonic origin, migration and therapeutic implications]. *Rev Neurol* 45, 535-546.
- Brown, D.A., London, E., 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.
- Brunner, C., Lassmann, H., Waehneldt, T.V., Matthieu, J.M., Linington, C., 1989. Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* 52, 296-304.
- Buckmaster, E.A., Gompels, U., Minson, A., 1984. Characterisation and physical mapping of an HSV-1 glycoprotein of approximately 115 X 10(3) molecular weight. *Virology* 139, 408-413.
- Buntinx, M., Vanderlocht, J., Hellings, N., Vandenabeele, F., Lambrichts, I., Raus, J., Ameloot, M., Stinissen, P., Steels, P., 2003. Characterization of three human oligodendroglial cell lines as a model to study oligodendrocyte injury: morphology and oligodendrocyte-specific gene expression. *J Neurocytol* 32, 25-38.
- Butt, A.M., Hamilton, N., Hubbard, P., Pugh, M., Ibrahim, M., 2005. Synantocytes: the fifth element. *J Anat* 207, 695-706.
- Butt, A.M., Kiff, J., Hubbard, P., Berry, M., 2002. Synantocytes: new functions for novel NG2 expressing glia. *J Neurocytol* 31, 551-565.
- Cai, W.H., Gu, B., Person, S., 1988. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J Virol* 62, 2596-2604.
- Campadelli-Fiume, G., Amasio, M., Avitabile, E., Cerretani, A., Forghieri, C., Gianni, T., Menotti, L., 2007. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev Med Virol* 17, 313-326.
- Casetta, I., Granieri, E., 2000. Clinical infections and multiple sclerosis: contribution from analytical epidemiology. *J Neurovirol* 6 Suppl 2, S147-151.
- Clark, D., 2004. Human herpesvirus type 6 and multiple sclerosis. *Herpes* 11 Suppl 2, 112A-119A.
- Clement, C., Tiwari, V., Scanlan, P.M., Valyi-Nagy, T., Yue, B.Y., Shukla, D., 2006. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol* 174, 1009-1021.
- Colombo, E., Banki, K., Tatum, A.H., Daucher, J., Ferrante, P., Murray, R.S., Phillips, P.E., Perl, A., 1997. Comparative analysis of antibody and cell-mediated autoimmunity to transaldolase and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 99, 1238-1250.

- Charpin, C., Gambarelli, D., Lavaut, M.N., Seigneurin, J.M., Raphael, M., Berard, M., Toga, M., 1985. Herpes simplex virus antigen detection in human acute encephalitis: an immunohistochemical study using avidin-biotin-peroxidase complex method. *Acta Neuropathol* 68, 245-252.
- Cheong, K.H., Zacchetti, D., Schneeberger, E.E., Simons, K., 1999. VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6241-6248.
- Christensen, T., 2007. Human herpesviruses in MS. *Int MS J* 14, 41-47.
- Dawson, M.R., Levine, J.M., Reynolds, R., 2000. NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 61, 471-479.
- Day, C.A., Kenworthy, A.K., 2009. Tracking microdomain dynamics in cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1788, 245-253.
- de Arriba Zerpa, G.A., Saleh, M.C., Fernandez, P.M., Guillou, F., Espinosa de los Monteros, A., de Vellis, J., Zakin, M.M., Baron, B., 2000. Alternative splicing prevents transferrin secretion during differentiation of a human oligodendrocyte cell line. *J Neurosci Res* 61, 388-395.
- de Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G., Vidal, M., 2003. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* 102, 4336-4344.
- de Marco, M.C., Martin-Belmonte, F., Kremer, L., Albar, J.P., Correas, I., Vaerman, J.P., Marazuela, M., Byrne, J.A., Alonso, M.A., 2002. MAL2, a novel raft protein of the MAL family, is an essential component of the machinery for transcytosis in hepatoma HepG2 cells. *J Cell Biol* 159, 37-44.
- de Marco, M.C., Puertollano, R., Martinez-Menarguez, J.A., Alonso, M.A., 2006. Dynamics of MAL2 during glycosylphosphatidylinositol-anchored protein transcytotic transport to the apical surface of hepatoma HepG2 cells. *Traffic* 7, 61-73.
- de Vries, H., Hoekstra, D., 2000. On the biogenesis of the myelin sheath: cognate polarized trafficking pathways in oligodendrocytes. *Glycoconj J* 17, 181-190.
- de Vries, H., Schrage, C., Hoekstra, D., 1998. An apical-type trafficking pathway is present in cultured oligodendrocytes but the sphingolipid-enriched myelin membrane is the target of a basolateral-type pathway. *Mol Biol Cell* 9, 599-609.
- Deber, C.M., Reynolds, S.J., 1991. Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clin Biochem* 24, 113-134.
- Debruin, L.S., Harauz, G., 2007. White matter rafting--membrane microdomains in myelin. *Neurochem Res* 32, 213-228.
- Deshmane, S.L., Fraser, N.W., 1989. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J Virol* 63, 943-947.
- Diefenbach, R.J., Miranda-Saksena, M., Douglas, M.W., Cunningham, A.L., 2008. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol* 18, 35-51.
- Divito, S., Cherpes, T.L., Hendricks, R.L., 2006. A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunol Res* 36, 119-126.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.
- Dohner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R., Sodeik,

- B., 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* 13, 2795-2809.
- Dubois-Dalcq, M., Behar, T., Hudson, L., Lazzarini, R.A., 1986. Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol* 102, 384-392.
- Durand, B., Raff, M., 2000. A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays* 22, 64-71.
- Dwyer, T., van der Mei, I., Ponsonby, A.L., Taylor, B.V., Stankovich, J., McKay, J.D., Thomson, R.J., Polanowski, A.M., Dickinson, J.L., 2008. Melanocortin 1 receptor genotype, past environmental sun exposure, and risk of multiple sclerosis. *Neurology* 71, 583-589.
- Efstathiou, S., Preston, C.M., 2005. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Res* 111, 108-119.
- Erne, B., Sansano, S., Frank, M., Schaeren-Wiemers, N., 2002. Rafts in adult peripheral nerve myelin contain major structural myelin proteins and myelin and lymphocyte protein (MAL) and CD59 as specific markers. *J Neurochem* 82, 550-562.
- Fazakerley, J.K., Walker, R., 2003. Virus demyelination. *J Neurovirol* 9, 148-164.
- Ferrante, P., Mancuso, R., Pagani, E., Guerini, F.R., Calvo, M.G., Saresella, M., Speciale, L., Caputo, D., 2000. Molecular evidences for a role of HSV-1 in multiple sclerosis clinical acute attack. *J Neurovirol* 6 Suppl 2, S109-114.
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R., Skalka, A.M., 2000. Principles of virology. ASM Press.
- Forrester, A., Farrell, H., Wilkinson, G., Kaye, J., Davis-Poynter, N., Minson, T., 1992. Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol* 66, 341-348.
- Frank, M., van der Haar, M.E., Schaeren-Wiemers, N., Schwab, M.E., 1998. rMAL is a glycosphingolipid-associated protein of myelin and apical membranes of epithelial cells in kidney and stomach. *J Neurosci* 18, 4901-4913.
- Franklin, R.J., 2002. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3, 705-714.
- Fulton, B.P., Burne, J.F., Raff, M.C., 1992. Visualization of O-2A progenitor cells in developing and adult rat optic nerve by quisqualate-stimulated cobalt uptake. *J Neurosci* 12, 4816-4833.
- Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- Galen, B., Cheshenko, N., Tuyama, A., Ramratnam, B., Herold, B.C., 2006. Access to nectin favors herpes simplex virus infection at the apical surface of polarized human epithelial cells. *J Virol* 80, 12209-12218.
- Gard, A.L., Pfeiffer, S.E., 1989. Oligodendrocyte progenitors isolated directly from developing telencephalon at a specific phenotypic stage: myelinogenic potential in a defined environment. *Development* 106, 119-132.
- Gianni, T., Campadelli-Fiume, G., Menotti, L., 2004. Entry of herpes simplex virus mediated by chimeric forms of nectin1 retargeted to endosomes or to lipid rafts occurs through acidic endosomes. *J Virol* 78, 12268-12276.
- Gibson, A., Futter, C.E., Maxwell, S., Allchin, E.H., Shipman, M., Kraehenbuhl, J.P., Domingo, D., Odorizzi, G., Trowbridge, I.S., Hopkins, C.R., 1998. Sorting mechanisms regulating membrane protein traffic in the apical transcytotic



- pathway of polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 143, 81-94.
- Gielen, E., Baron, W., Vandeven, M., Steels, P., Hoekstra, D., Ameloot, M., 2006. Rafts in oligodendrocytes: evidence and structure-function relationship. *Glia* 54, 499-512.
- Goodman, A.D., Mock, D.J., Powers, J.M., Baker, J.V., Blumberg, B.M., 2003. Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J Infect Dis* 187, 1365-1376.
- Gran, B., Rostami, A., 2001. T cells, cytokines, and autoantigens in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 1, 263-270.
- Grau Lopez, L., Sedano Tous, M.J., Ramo Tello, C., 2007. [Multiple sclerosis and herpes encephalitis]. *Med Clin (Barc)* 129, 356.
- Greenwood, K., Butt, A., 2002. 22: NG2 glia (oligodendrocyte progenitor cells) do not give rise to oligodendrocytes in the absence of axons in vivo but do in vitro. *J Anat* 200, 206-207.
- Greenwood, K., Butt, A.M., 2003. Evidence that perinatal and adult NG2-glia are not conventional oligodendrocyte progenitors and do not depend on axons for their survival. *Mol Cell Neurosci* 23, 544-558.
- Greer, J.M., Pender, M.P., 2008. Myelin proteolipid protein: an effective autoantigen and target of autoimmunity in multiple sclerosis. *J Autoimmun* 31, 281-287.
- Guzman, G., Oh, S., Shukla, D., Engelhard, H.H., Valyi-Nagy, T., 2006. Expression of entry receptor nectin-1 of herpes simplex virus 1 and/or herpes simplex virus 2 in normal and neoplastic human nervous system tissues. *Acta Virol* 50, 59-66.
- Haigh, A., Greaves, R., O'Hare, P., 1990. Interference with the assembly of a virus-host transcription complex by peptide competition. *Nature* 344, 257-259.
- Hao, M., Maxfield, F.R., 2000. Characterization of rapid membrane internalization and recycling. *J Biol Chem* 275, 15279-15286.
- Hayashi, T., Su, T.P., 2004. Sigma-1 receptors at galactosylceramide-enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14949-14954.
- Hegmans, J.P., Gerber, P.J., Lambrecht, B.N., 2008. Exosomes. *Methods Mol Biol* 484, 97-109.
- Hellings, N., Raus, J., Stinissen, P., 2002. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res* 25, 27-51.
- Herrera, F.J., Triezenberg, S.J., 2004. VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection. *J Virol* 78, 9689-9696.
- Hoekstra, D., Maier, O., van der Wouden, J.M., Slimane, T.A., van, I.S.C., 2003. Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids. *J Lipid Res* 44, 869-877.
- Hoekstra, D., Tyteca, D., van, I.S.C., 2004. The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development. *J Cell Sci* 117, 2183-2192.
- Horgan, C.P., Oleksy, A., Zhdanov, A.V., Lall, P.Y., White, I.J., Khan, A.R., Futter, C.E., McCaffrey, J.G., McCaffrey, M.W., 2007. Rab11-FIP3 is critical for the structural integrity of the endosomal recycling compartment. *Traffic* 8, 414-430.
- Ihrke, G., Martin, G.V., Shanks, M.R., Schrader, M., Schroer, T.A., Hubbard, A.L., 1998. Apical plasma membrane proteins and endolyn-78 travel through a subapical compartment in polarized WIF-B hepatocytes. *J Cell Biol* 141, 115-

- 133.
- Itzhaki, R.F., Lin, W.R., Shang, D., Wilcock, G.K., Faragher, B., Jamieson, G.A., 1997. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 241-244.
- Jerome, K.R., Fox, R., Chen, Z., Sarkar, P., Corey, L., 2001. Inhibition of apoptosis by primary isolates of herpes simplex virus. *Arch Virol* 146, 2219-2225.
- Jerome, K.R., Fox, R., Chen, Z., Sears, A.E., Lee, H., Corey, L., 1999. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol* 73, 8950-8957.
- Jung, M., Kramer, E., Grzenkowski, M., Tang, K., Blakemore, W., Aguzzi, A., Khazaie, K., Chlichlia, K., von Blankenfeld, G., Kettenmann, H., et al., 1995. Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *Eur J Neurosci* 7, 1245-1265.
- Kastrukoff, L.F., Kim, S.U., 2002. Oligodendrocytes from human donors differ in resistance to herpes simplex virus 1 (HSV-1). *Glia* 38, 87-92.
- Kastrukoff, L.F., Lau, A.S., Kim, S.U., 1987. Multifocal CNS demyelination following peripheral inoculation with herpes simplex virus type 1. *Ann Neurol* 22, 52-59.
- Kent, J.R., Kang, W., Miller, C.G., Fraser, N.W., 2003. Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *J Neurovirol* 9, 285-290.
- Kettenmann, H., Gilbert, P., Schachner, M., 1984. Depolarization of cultured oligodendrocytes by glutamate and GABA. *Neurosci Lett* 47, 271-276.
- Kim, T., Fiedler, K., Madison, D.L., Krueger, W.H., Pfeiffer, S.E., 1995. Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 42, 413-422.
- Kim, T., Pfeiffer, S.E., 1999. Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG. *J Neurocytol* 28, 281-293.
- Knipe, D.M., Cliffe, A., 2008. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* 6, 211-221.
- Knopf, C.W., 2000. Molecular mechanisms of replication of herpes simplex virus 1. *Acta Virol* 44, 289-307.
- Koyama, A.H., Uchida, T., 1987. The mode of entry of herpes simplex virus type 1 into Vero cells. *Microbiol Immunol* 31, 123-130.
- Kragt, J., van Amerongen, B., Killestein, J., Dijkstra, C., Uitdehaag, B., Polman, C., Lips, P., 2009. Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. *Mult Scler* 15, 9-15.
- Kramer, E., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Mobius, W., Berger, H., Nave, K.A., Schild, H., Trotter, J., 2007. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin App* 1, 1446-1461.
- Kramer, E.M., Koch, T., Niehaus, A., Trotter, J., 1997. Oligodendrocytes direct glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins to the myelin sheath in glycosphingolipid-rich complexes. *J Biol Chem* 272, 8937-8945.
- Kramer, E.M., Schardt, A., Nave, K.A., 2001. Membrane traffic in myelinating oligodendrocytes. *Microsc Res Tech* 52, 656-671.
- Kroepfl, J.F., Gardinier, M.V., 2001. Identification of a basolateral membrane targeting

- signal within the cytoplasmic domain of myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *J Neurochem* 77, 1301-1309.
- Lakkaraju, A., Rodriguez-Boulan, E., 2008. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol* 18, 199-209.
- Lara-Pezzi, E., Serrador, J.M., Montoya, M.C., Zamora, D., Yanez-Mo, M., Carretero, M., Furthmayr, H., Sanchez-Madrid, F., Lopez-Cabrera, M., 2001. The hepatitis B virus X protein (HBx) induces a migratory phenotype in a CD44-dependent manner: possible role of HBx in invasion and metastasis. *Hepatology* 33, 1270-1281.
- Lee, A.G., 2001. Myelin: Delivery by raft. *Curr Biol* 11, R60-62.
- Lee, G.E., Church, G.A., Wilson, D.W., 2003. A subpopulation of tegument protein vhs localizes to detergent-insoluble lipid rafts in herpes simplex virus-infected cells. *J Virol* 77, 2038-2045.
- Leinbach, S.S., Summers, W.C., 1980. The structure of herpes simplex virus type 1 DNA as probed by micrococcal nuclease digestion. *J Gen Virol* 51, 45-59.
- Levine, B., Deretic, V., 2007. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7, 767-777.
- Levison, S.W., Goldman, J.E., 1993. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10, 201-212.
- Levy, D.N., Fernandes, L.S., Williams, W.V., Weiner, D.B., 1993. Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 vpr. *Cell* 72, 541-550.
- Libbey, J.E., McCoy, L.L., Fujinami, R.S., 2007. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 79, 127-147.
- Ligas, M.W., Johnson, D.C., 1988. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol* 62, 1486-1494.
- MacLean, H.J., Freedman, M.S., 2009. Multiple sclerosis: following clues from cause to cure. *Lancet Neurol* 8, 6-8.
- Maggs, D.J., Chang, E., Nasisse, M.P., Mitchell, W.J., 1998. Persistence of herpes simplex virus type 1 DNA in chronic conjunctival and eyelid lesions of mice. *J Virol* 72, 9166-9172.
- Maier, O., Hoekstra, D., 2003. Trans-Golgi network and subapical compartment of HepG2 cells display different properties in sorting and exiting of sphingolipids. *J Biol Chem* 278, 164-173.
- Marazuela, M., Acevedo, A., Garcia-Lopez, M.A., Adrados, M., de Marco, M.C., Alonso, M.A., 2004. Expression of MAL2, an integral protein component of the machinery for basolateral-to-apical transcytosis, in human epithelia. *J Histochem Cytochem* 52, 243-252.
- Marbet, P., Rahner, C., Stieger, B., Landmann, L., 2006. Quantitative microscopy reveals 3D organization and kinetics of endocytosis in rat hepatocytes. *Microsc Res Tech* 69, 693-707.
- Marozin, S., Prank, U., Sodeik, B., 2004. Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. *J Gen Virol* 85, 775-786.
- Martin-Belmonte, F., Puertollano, R., Millan, J., Alonso, M.A., 2000. The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in

- the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines. *Mol Biol Cell* 11, 2033-2045.
- Matis, J., Kudelova, M., 2001. Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses. *Acta Virol* 45, 269-277.
- Matute, C., Perez-Cerda, F., 2005. Multiple sclerosis: novel perspectives on newly forming lesions. *Trends Neurosci* 28, 173-175.
- Mayor, S., Presley, J.F., Maxfield, F.R., 1993. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J Cell Biol* 121, 1257-1269.
- Meinl, E., Hohlfeld, R., 2002. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: MBP and beyond. *Clin Exp Immunol* 128, 395-397.
- Mestecky, J., Bienenstock, J., Lamm, M., Strober, W., McGhee, J., 2005. *Mucosal immunology*. Elsevier Academic Press.
- Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., Granzow, H., 2006. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* 9, 423-429.
- Milne, R.S., Nicola, A.V., Whitbeck, J.C., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., 2005. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 79, 6655-6663.
- Miller, G., 2005. Neuroscience. The dark side of glia. *Science* 308, 778-781.
- Miller, R.H., Mi, S., 2007. Dissecting demyelination. *Nat Neurosci* 10, 1351-1354.
- Miyake, E., 1979. Establishment of a human oligodendroglial cell line. *Acta Neuropathol (Berl)* 46, 51-55.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Nait-Oumesmar, B., Decker, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., Van Evercooren, A.B., 1999. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 11, 4357-4366.
- Ndubaku, U., de Bellard, M.E., 2008. Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem* 110, 182-195.
- Nicola, A.V., McEvoy, A.M., Straus, S.E., 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol* 77, 5324-5332.
- Nicola, A.V., Straus, S.E., 2004. Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. *J Virol* 78, 7508-7517.
- Niemann, S., Sereda, M.W., Rossner, M., Stewart, H., Suter, U., Meinck, H.M., Griffiths, I.R., Nave, K.A., 1999. The "CMT rat": peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. *Ann N Y Acad Sci* 883, 254-261.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., Zhu, X., 2009. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10, 9-22.
- Noseworthy, J.H., 1999. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399, A40-47.
- Orvedahl, A., Alexander, D., Talloczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D.A., Levine, B., 2007. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* 1, 23-35.
- Palade, G.E., Bruns, R.R., 1968. Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J*

- Cell Biol 37, 633-649.
- Perea, G., Araque, A., 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317, 1083-1086.
- Pereyra, P.M., Horvath, E., Braun, P.E., 1988. Triton X-100 extractions of central nervous system myelin indicate a possible role for the minor myelin proteins in the stability in lamellae. *Neurochem Res* 13, 583-595.
- Pietropaolo, V., Fioriti, D., Mischitelli, M., Anzivino, E., Santini, M., Millefiorini, E., Di Rezze, S., Degener, A.M., 2005. Detection of human herpesviruses and polyomaviruses DNA in a group of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *New Microbiol* 28, 199-203.
- Post, G.R., Dawson, G., 1992. Characterization of a cell line derived from a human oligodendroglioma. *Mol Chem Neuropathol* 16, 303-317.
- Raff, M.C., Miller, R.H., Noble, M., 1983. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303, 390-396.
- Rajcani, J., Andrea, V., Ingeborg, R., 2004. Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes* 28, 293-310.
- Ramalingam, T.S., Detmer, S.A., Martin, W.L., Bjorkman, P.J., 2002. IgG transcytosis and recycling by FcRn expressed in MDCK cells reveals ligand-induced redistribution. *Embo J* 21, 590-601.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hygiene* 27, 493-497.
- Reske, A., Pollara, G., Krummenacher, C., Chain, B.M., Katz, D.R., 2007. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* 17, 205-215.
- Rodriguez-Violante, M., Ordonez, G., Bermudez, J.R., Sotelo, J., Corona, T., 2009. Association of a history of varicella virus infection with multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 111, 54-56.
- Roizman, B., Gu, H., Mandel, G., 2005. The first 30 minutes in the life of a virus: unREST in the nucleus. *Cell Cycle* 4, 1019-1021.
- Rojo, G., Chamorro, M., Salas, M.L., Vinuela, E., Cuezva, J.M., Salas, J., 1998. Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J Virol* 72, 7583-7588.
- Roop, C., Hutchinson, L., Johnson, D.C., 1993. A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells, and its particles lack glycoprotein H. *J Virol* 67, 2285-2297.
- Sanders, V.J., Waddell, A.E., Felisan, S.L., Li, X., Conrad, A.J., Tourtellotte, W.W., 1996. Herpes simplex virus in postmortem multiple sclerosis brain tissue. *Arch Neurol* 53, 125-133.
- Sanderson, C.M., Smith, G.L., 1999. Cell motility and cell morphology: how some viruses take control. *Expert Rev Mol Med* 1999, 1-16.
- Sanfilippo, C.M., Chirimuuta, F.N., Blaho, J.A., 2004. Herpes simplex virus type 1 immediate-early gene expression is required for the induction of apoptosis in human epithelial HEp-2 cells. *J Virol* 78, 224-239.
- Saraste, J., Goud, B., 2007. Functional symmetry of endomembranes. *Mol Biol Cell* 18, 1430-1436.
- Sarchielli, P., Trequattrini, A., Usai, F., Murasecco, D., Gallai, V., 1993. Role of viruses in the etiopathogenesis of multiple sclerosis. *Acta Neurol (Napoli)* 15, 363-381.

- Scolding, N., Franklin, R., Stevens, S., Heldin, C.H., Compston, A., Newcombe, J., 1998. Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain* 121 ( Pt 12), 2221-2228.
- Schaeren-Wiemers, N., Bonnet, A., Erb, M., Erne, B., Bartsch, U., Kern, F., Mantei, N., Sherman, D., Suter, U., 2004. The raft-associated protein MAL is required for maintenance of proper axon--glia interactions in the central nervous system. *J Cell Biol* 166, 731-742.
- Schaeren-Wiemers, N., Valenzuela, D.M., Frank, M., Schwab, M.E., 1995. Characterization of a rat gene, rMAL, encoding a protein with four hydrophobic domains in central and peripheral myelin. *J Neurosci* 15, 5753-5764.
- Schneider, A., Lander, H., Schulz, G., Wolburg, H., Nave, K.A., Schulz, J.B., Simons, M., 2005. Palmitoylation is a sorting determinant for transport to the myelin membrane. *J Cell Sci* 118, 2415-2423.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., van Meer, G., 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202.
- Simons, M., Kramer, E.M., Thiele, C., Stoffel, W., Trotter, J., 2000. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* 151, 143-154.
- Simons, M., Trotter, J., 2007. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol* 17, 533-540.
- Simpson, R.J., Jensen, S.S., Lim, J.W., 2008. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 8, 4083-4099.
- Skoldenborg, B., 1996. Herpes simplex encephalitis. *Scand J Infect Dis Suppl* 100, 8-13.
- Skorstad, G., Vandvik, B., Vartdal, F., Holmoy, T., 2009. MS and clinically isolated syndromes: Shared specificity but diverging clonal patterns of virus-specific IgG antibodies produced in vivo and by CSF B cells in vitro. *Eur J Neurol*.
- Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23, 683-747.
- Spear, P.G., 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 6, 401-410.
- Stohlman, S.A., Hinton, D.R., 2001. Viral induced demyelination. *Brain Pathol* 11, 92-106.
- Taddeo, B., Roizman, B., 2006. The virion host shutoff protein (UL41) of herpes simplex virus 1 is an endoribonuclease with a substrate specificity similar to that of RNase A. *J Virol* 80, 9341-9345.
- Taddeo, B., Zhang, W., Roizman, B., 2006. The U(L)41 protein of herpes simplex virus 1 degrades RNA by endonucleolytic cleavage in absence of other cellular or viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2827-2832.
- Talloczy, Z., Virgin, H.W.t., Levine, B., 2006. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy* 2, 24-29.
- Temple, S., 2001. The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-117.
- Temple, S., Raff, M.C., 1986. Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* 44, 773-779.
- Trapp, B.D., Nishiyama, A., Cheng, D., Macklin, W., 1997. Differentiation and death of

- premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *J Cell Biol* 137, 459-468.
- Trotter, J., 1993. The development of myelin-forming glia: studies with primary cell cultures and immortalized cell lines. *Perspect Dev Neurobiol* 1, 149-154.
- Turcotte, S., Letellier, J., Lippe, R., 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* 79, 8847-8860.
- van IJzendoorn, S.C., Hoekstra, D., 1998. (Glyco)sphingolipids are sorted in sub-apical compartments in HepG2 cells: a role for non-Golgi-related intracellular sites in the polarized distribution of (glyco)sphingolipids. *J Cell Biol* 142, 683-696.
- van IJzendoorn, S.C., Hoekstra, D., 1999. The subapical compartment: a novel sorting centre? *Trends Cell Biol* 9, 144-149.
- van Meer, G., Simons, K., 1988. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 36, 51-58.
- Verkhratsky, A., Butt, A., 2007. *Glial neurobiology*. Wiley.
- Wagner, H.J., Munger, K.L., Ascherio, A., 2004. Plasma viral load of Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 11, 833-834.
- Wang, Q.Y., Zhou, C., Johnson, K.E., Colgrove, R.C., Coen, D.M., Knipe, D.M., 2005. Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16055-16059.
- Whitley, R.J., Roizman, B., 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357, 1513-1518.
- Wilson, S.H., Bailey, A.M., Nourse, C.R., Mattei, M.G., Byrne, J.A., 2001. Identification of MAL2, a novel member of the mal proteolipid family, though interactions with TPD52-like proteins in the yeast two-hybrid system. *Genomics* 76, 81-88.
- Wozniak, M.A., Mee, A.P., Itzhaki, R.F., 2009. Herpes simplex virus type 1 DNA is located within Alzheimer's disease amyloid plaques. *J Pathol* 217, 131-138.
- Wustner, D., Herrmann, A., Hao, M., Maxfield, F.R., 2002. Rapid nonvesicular transport of sterol between the plasma membrane domains of polarized hepatic cells. *J Biol Chem* 277, 30325-30336.
- Yamada, E., 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 445-458.
- Yankaskas, J.R., Haizlip, J.E., Conrad, M., Koval, D., Lazarowski, E., Paradiso, A.M., Rinehart, C.A., Jr., Sarkadi, B., Schlegel, R., Boucher, R.C., 1993. Papilloma virus immortalized tracheal epithelial cells retain a well-differentiated phenotype. *Am J Physiol* 264, C1219-1230.
- Zacchetti, D., Peranen, J., Murata, M., Fiedler, K., Simons, K., 1995. VIP17/MAL, a proteolipid in apical transport vesicles. *FEBS Lett* 377, 465-469.
- Zalc, B., 2006. The acquisition of myelin: a success story. *Novartis Found Symp* 276, 15-21; discussion 21-15, 54-17, 275-281.





